

UNIVERSITÉ DE CLERMONT
FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

Année 1970

N

THÈSE

pour le

DOCTORAT EN PHARMACIE

(Diplôme d'Université)

par

Philippe G O U G É

Interne des Hôpitaux

Présentée et soutenue publiquement le 23 octobre 1970

VARIATIONS DE LA LACTATE DESHYDROGENASE
ET DE SES ISOENZYMES
SOUS L'INFLUENCE DE QUELQUES ANTI-INFLAMMATOIRES
NON STEROIDIQUES

Président du Jury : M. P. BASTIDE, Professeur

Membres du Jury : M. P. TRONCHE, Professeur
M. R. CLUZEL, Professeur

CLERMONT - REPRODUCTION

64, avenue Jean Noellet

63 - AUBIERE (1970)



Digitized by the Internet Archive
in 2026

UNIVERSITÉ DE CLERMONT

FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

Année 1970

N

THÈSE

pour le

DOCTORAT EN PHARMACIE

(Diplôme d'Université)

par

Philippe G O U G É

Interne des Hôpitaux

Présentée et soutenue publiquement le 23 octobre 1970

VARIATIONS DE LA LACTATE DESHYDROGENASE ET DE SES ISOENZYMES

SOUS L'INFLUENCE DE QUELQUES ANTI-INFLAMMATOIRES
NON STEROIDIQUES

Président du Jury : M. P. BASTIDE, Professeur

Membres du Jury : M. P. TRONCHE, Professeur
M. R. CLUZEL, Professeur

CLERMONT - REPRODUCTION

64, avenue Jean Noellet

63 - AUBIERE (1970)

UNIVERSITE

DE

FACULTE MIXTE DE MEDECINE et de PHARMACIE

CLERMONT

Doyen : G. MEYNIEL

Assesseur : M. COULET

Doyen Honoraire : M. CUVELIER Directeur Honoraire : M. MERLE

Professeurs Honoraires : Mme BLANQUET - MM. BUREAU,
M. POMMÉ - M. WILLEMIN-CLOG

I - Professeurs Titulaires.

MM. BARRIER	Clinique Chirurgicale A
BASTIDE	Chimie Biologique et Pharmacodynamie
BAUDON	Clinique Obstétricale
BERGER	Chimie Analytique
BERGERON	Pathologie Médicale
COULET	Botanique et Microbiologie
CUVELIER	Hydrologie et Climatologie
DASTUGUE	Biochimie Médicale
DAUPHIN	Chimie Pharmaceutique et Toxicologie
DELAGE	Anatomie Pathologique
DUCHENE-MARULLAZ	Pharmacologie
FEBVRE	Pharmacie Galénique
Mme GAILLARD	Physique Pharmaceutique
MM. GERMAIN	Clinique Chirurgicale B
GRAS	Clinique Médicale A
JACQUEMET	Technique Chirurgicale
JALLUT	Séméiologie Médicale
LATAIX	Pathologie Chirurgicale
MERCIER	Anatomie
MEYNIEL	Biophysique Médicale
MOLINA	Clinique Pneumo-Phtisiologique
PETIT	Médecine Légale et Médecine Sociale
POROT	Clinique Neurologique et Psychiatrique
POURRAT	Matière Médicale
Melle RAMPON	Thérapeutique
MM. ROUHER	Clinique Ophtalmologique
TERRASSE	Clinique Médicale B
THIEBLOT	Physiologie
THOMAS	Clinique Oto-Rhino-Laryngologique
TRONCHE	Pharmacie Chimique
TURCHINI	Histologie et Embryologie
VAURS	Bactériologie et Hygiène

II - Professeurs Titulaires à Titre Personnel.

MM. ALFIERI	Biophysique Médicale
CHAMPEIX	Médecine Légale et Médecine du Travail
VIALLET	Electro-Radiologie

III - Professeurs sans chaire

Mle. CHATONIER

MM. CLUZEL

MENUT

PIGNIDE

Mme POURRAT

Chimie Minérale et Minéralogie

Bactériologie

Pédiatrie et Puériculture

Médecine Générale

Matière Médicale

IV - Maîtres de Conférences Agrégés.

MM. AIACHE (Délégué)

ANDRAUD

BAGUET

BOUCHER

BOURDEIX

BOYER (Délégué)

CONSTANTIN

COUQUELET

GAILLARD DE COLLOGNY

GENTOU

GUILLOT (Délégué)

MALET

MARCHEIX

Mme MOINADE

PERI

Mme PETIT

PLAGNE

RAYNAUD

SOLE

VENRIES de LAGUILLAUMIE

Pharmacie Galénique

Toxicologie

Thérapeutique, réanimation Médicale

Physiologie

Chirurgie Générale

Chimie biologique et Pharmacodynamie

Anesthésiologie

Pharmacie Chimique

Oto-Rhino Laryngologie

Biochimie Médicale

Botanique et Microbiologie

Histologie, Embryologie, Cytogénétique

Médecine Interne

Médecine Générale et Thérapeutique

Stomatologie

Chimie Analytique

Cancérologie Clinique

Pédiatrie

Ophthalmologie

Anatomie Pathologique

V - Agrégés

MM. FOURRIER

HOUDARD

JANNY

RENARD

TOURNILHAC

Orthopédie

Chirurgie Générale

Neuro-Chirurgie

Pneumo-Phtisiologie

Neurologie et Psychiatrie

Attaché Principal : M. BERTHON

Conservateur de la Bibliothèque : M. ARCHIMBAUD

La Faculté décide que les opinions émises dans les travaux et mémoires présentées à l'occasion d'une soutenance de Thèse de Doctorat en Médecine ou en Pharmacie doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle n'entend leur donner ni approbation, ni improbation (Délibération du 6 Juin 1956).

AVANT PROPOS

Qu'il nous soit permis au début de ce travail d'exprimer notre profonde gratitude à tous nos Maîtres de la Faculté de Médecine et de Pharmacie. L'excellent enseignement qu'ils nous ont prodigué tout au long de nos études restera le meilleur guide au cours de notre vie professionnelle.

Nous tenons à remercier plus particulièrement :

- Monsieur le Professeur BASTIDE qui nous a fait l'honneur de nous accueillir dans son Laboratoire universitaire après nous avoir dirigé dans nos fonctions d'Interne en Pharmacie au Centre Hospitalier.

Il nous a inspiré le sujet de cette thèse et nous a sans cesse orienté dans nos recherches. Sa bienveillance à notre égard a contribué à nous faire apprécier ses grandes qualités humaines et scientifiques.

Qu'il veuille bien trouver ici l'expression de notre fidèle attachement et de nos sentiments de très profonde reconnaissance.

- Monsieur le Professeur TRONCHE dont nous avons connu la richesse et la clarté de son enseignement. Qu'il veuille trouver ici l'expression de notre respectueuse gratitude.

- Monsieur le Professeur CLUZEL qui nous a fait l'honneur de juger cette thèse. Nous l'en remercions et l'assurons de nos sentiments respectueux.

Enfin, nous tenons à associer ici dans une même pensée nos camarades d'études et spécialement les Internes en Pharmacie du Centre Hospitalier, le personnel du Laboratoire de Chimie Biologique et de Pharmacodynamie, Mademoiselle JONADET, Chargée de Recherches au C.N.R.S. et Madame DELILLE, Aide-Biologiste au C.N.R.S.

Qu'ils soient assurés de notre amical souvenir.

INTRODUCTION

« Le processus de l'inflammation reste un problème passionnant avec de multiples facettes souvent mal éclairées ».

M. NEUMAN

(Symp. Intern. Inflammation et Anti-inflammatoires, Bologna, 1967).

La thérapeutique anti-inflammatoire demeure toujours au premier plan de l'actualité mais les problèmes qu'elle pose sont loin d'être élucidés. Après la période d'enthousiasme qui a succédé à la découverte de l'action anti-inflammatoire des glucocorticoïdes, une certaine réserve est apparue à l'examen des nombreux inconvénients de la corticothérapie.

L'apparition des nouveaux anti-inflammatoires de structure non stéroïdique est venue susciter un regain d'enthousiasme pour cette thérapeutique mais là encore, cette ferveur a été freinée par les inconvénients qui ont été attribués à ces nouvelles molécules.

Aussi, n'est-il pas surprenant que dans un laboratoire qui examine depuis plusieurs années les problèmes d'enzymo-pharmacologie comme le Laboratoire de Chimie Biologique et de Pharmacodynamie de la Faculté mixte de Médecine et de Pharmacie de Clermont-Ferrand, il nous ait été confié par Monsieur le Professeur BASTIDE, l'examen des interférences de quelques composés de cette série avec les réactions métaboliques catalysées par la lactate déshydrogénase et ses isoenzymes.

Notre mémoire sera donc tout naturellement divisé ainsi qu'il suit :

— Dans une première partie consacrée aux recherches bibliographiques, nous trouverons :

- Chapitre I : La lactate déshydrogénase et ses isoenzymes
- Chapitre II : Quelques anti-inflammatoires non stéroïdiques
 - I - L'indométacine
 - II - L'oxyphenbutazone
 - III - L'acide niflumique
 - IV - L'acide métiazinique.

— Dans une deuxième partie consacrée aux recherches expérimentales seront tour à tour examinés :

Les techniques expérimentales

- Chapitre I : Protocole général d'expérimentation
- Chapitre II : Dosage de la lactate deshydrogénase
- Chapitre III : Séparation des isoenzymes de la lactate deshydrogénase.

Les résultats expérimentaux

- Chapitre I : Etude de la lactate deshydrogénase du cerveau de Lapin
- Chapitre II : Etude de la lactate deshydrogénase du coeur de Lapin
- Chapitre III : Etude de la lactate deshydrogénase du foie de Lapin
- Chapitre IV : Etude de la lactate deshydrogénase du muscle jambier de Lapin
- Chapitre V : Etude de la lactate deshydrogénase des reins de Lapin
- Chapitre VI : Etude de la lactate deshydrogénase des glandes surrénales de Lapin
- Chapitre VII : Etude de la lactate deshydrogénase du sérum de Lapin
- Chapitre VIII : Etude de la lactate deshydrogénase des hématies de Lapin.

— Enfin, les principaux résultats sont résumés et discutés dans une Conclusion Générale.

ABREVIATIONS UTILISEES

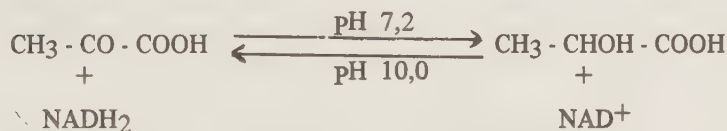
LDH	: Lactate deshydrogénase
NAD	: Nicotinamide adénine dinucléotide
DPN	: Diphospho-pyridine nucléotide
NADH ₂	: Nicotinamide - adénine dinucléotide réduit
DPNH ₂	: Diphospho-pyridine nucléotide réduit
NADP	: Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NADPH ₂	: Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit
ADP ribose ADPR	: Ribotide adénosine diphosphate
FAD	: Flavine adénine dinucléotide
ACPase	: Phospatase acide
AINS	: Anti-inflammatoire non stéroïdique

CHAPITRE I

LA LACTATE DESHYDROGENASE ET SES ISOENZYMES (EC 1.1.1.27)

I - INTRODUCTION

La lactate deshydrogénase, connue également sous le nom de pyruvate-réductase ou de lactate - NAD (+) oxydoréductase catalyse la réaction suivante :



L'équilibre au pH physiologique est en faveur de la formation de lactate. Cette réaction constitue une étape primordiale dans le catabolisme glucidique en aérobiose.

A - Découverte et isolement

THUNBERG en 1920 découvrit un enzyme tissulaire qui oxydait le lactate et dont l'activité dépendait d'un co-facteur hydrosoluble (122).

Des extraits cellulaires, possédant une activité lactate-déshydrogénasique furent utilisés la première fois en 1932 (6).

STRAUB (119) isole la LDH (++) sous forme cristallisée à partir du coeur de boeuf.

KUBOWITZ et OTT (67) ont préparé un enzyme similaire, cristallisé sous forme de sel mercurique à partir de tissus musculaires de rat. L'enzyme ainsi obtenu est inactif, mais retrouve son activité par dialyse contre cystéine.

(++) Lactate déshydrogénase.

On a plus récemment cristallisé l'enzyme de foie de rat (47). La composition en acides aminés de plusieurs LDH animales a été déterminée (35). Les muscles d'insectes seraient dépourvus de cet enzyme.

Des préparations d'enzyme cristallisé ont été décrites à partir du coeur de boeuf (119), du muscle squelettique de rat et de sarcome de rat (67), de muscle squelettique de lapin (15, 101), de foie de rat (47), de coeur de rat (133) et de coeur humain (83).

B - Les formes multiples de la lactate déshydrogénase.

On fut amené à admettre l'existence de plusieurs formes de la LDH. En 1957, cette multiplicité a été démontrée par VESELL et BEARN (125), SAYRE et HILL (109). MARKERT et MOLLER (72) ont introduit en 1959 le terme « d'Isozyme » pour désigner les multiples formes moléculaires des enzymes ; mais actuellement, on donne la préférence au terme « isoenzyme » (WEBB, 1965) (130).

On entend par « isoenzymes » les enzymes qui, dans la même espèce, catalysent la même réaction chimique et présentent une constitution protéinique voisine mais se laissant néanmoins séparer par les différentes méthodes de la chimie protéinique.

Les isoenzymes de la LDH sont parmi les isoenzymes ceux qui furent le mieux étudiés et sont parmi les seuls à avoir trouvé des applications cliniques (infarctus du myocarde, nécrose hépatique, anémie pernicieuse et affections musculaires).

WIEME en 1959 (135) a montré qu'il existait effectivement dans les tissus de l'Homme, du Rat et de la Souris, ainsi que dans le sérum humain, cinq isoenzymes de la LDH. Ces cinq formes de la LDH représentent depuis les travaux de MARKERT (71) des tétramères. La composition en acides aminés des sous-unités est différente mais le poids moléculaire est comparable.

Chacun de ces isoenzymes porte une charge électrique différente : de sorte que la séparation des différentes fractions par électrophorèse devient possible. La LDH 1 porte la charge électrique négative la plus forte. La LDH 5 n'est pratiquement pas chargée électriquement.

Pendant l'électrophorèse, la LDH 1 se déplacera vers l'anode tandis que la LDH 5 ne se déplacera pas. La LDH 1 et la LDH 2 sont souvent appelées les formes rapides de la LDH, en contraste avec les formes lentes, la LDH 4 et la LDH 5.

En dépit de l'emploi de techniques parfois très différentes, comme l'électrophorèse en gélose [WIEME (135, 136)] l'électrophorèse en support d'amidon VESELL et BEARN (125), l'électrophorèse sur papier SAYRE et HILL (109), l'électrophorèse sur membrane d'acétate de cellulose PRESTON

et coll. (99) ou en gel d'acrylamide, les résultats des différents auteurs sont assez comparables. Le fait vient d'être encore souligné par VESELL (124) .

La LDH 1 est la fraction prédominante dans le muscle cardiaque. Elle est souvent appelée fraction cardiaque, fraction H (heart), enzyme H ou type H.

La LDH 5 par contre, prédomine dans les tissus hépatiques, le muscle strié et la peau et on la désigne couramment comme fraction hépatique, fraction musculaire, fraction M, enzyme M ou type M.

PLAGEMAN, GREGORY et WROBLEWSKI (96) ont démontré que la LDH 5 continue à exercer son activité à une concentration de pyruvate, dix fois plus forte que la concentration optimale pour la LDH 1.

Un excès de pyruvate inhibera la LDH 1 plutôt que la LDH 5, certains auteurs BONAVITA et coll. (19) ont d'ailleurs utilisé cette caractéristique pour différencier les différentes formes de la LDH. Dans un tissu présentant une bonne oxygénation, la LDH 1 prédomine tandis que la LDH 5 se trouve surtout dans les tissus où il y a production d'acide lactique, comme dans le muscle strié.

PFLEIDERER et WACHSMUTH (95) croient pouvoir conclure que la LDH 1, LDH 2 et LDH 3 représentent plutôt la glycolyse aérobie. C'est ainsi que la LDH 1 et la LDH 2 sont parfois appelées les fractions aérobies de la lacticodéshydrogénase et la LDH 4 et la LDH 5, les fractions anaérobies.

La LDH 5 va plutôt catalyser la réaction : acide pyruvique $\longrightarrow$ acide lactique, ce qui en l'absence d'oxygène, régénère la forme réduite du coenzyme A. La LDH 3 par contre favorise la réaction : acide lactique $\longrightarrow$ acide pyruvique après quoi l'acide pyruvique pourra être catabolisé suivant le cycle de Krebs avec une production d'énergie beaucoup plus élevée.

La LDH 1 qui est retrouvée dans le muscle cardiaque permettra au coeur d'extraire du lactate, du sang artériel et de le cataboliser en passant par le pyruvate dans le cycle de Krebs [GOODFRIEND et KAPLAN (50)]. Pour la contraction statique du muscle strié par contre la LDH 5 conviendra le mieux [DAWSON et coll. (28)].

Tous les tissus excepté les globules rouges, contiennent ces cinq fractions de la LDH. Dans les spermatozoïdes, BLANCO et ZINKHAM (16) ont décelé la présence d'un sixième isoenzyme (LD X) dont la vitesse de migration est intermédiaire entre celles de la LDH 3 et de la LDH 4. FIELDHOUSE et MASTERS (39) ont démontré qu'il existait plus de cinq isoenzymes chez l'embryon de cobaye (9 jours).

La concentration relative de chaque fraction diffère toutefois d'un tissu à l'autre. L'équilibre entre les fractions lentes (LDH 5 et LDH 4) et rapides (LDH 1 et LDH 2) de la LDH dans les tissus va refléter le métabolisme intermédiaire de ces tissus.

II - PROPRIETES MOLECULAIRES DE L'ENZYME

A - Pureté des préparations cristallisées.

La purification d'un enzyme consiste à isoler une protéine enzymatique spécifique d'un extrait brut de cellules entières contenant beaucoup d'autres composés.

Les cristaux préparés par la méthode de STRAUB (119) furent toujours contaminés d'une quantité importante de substance amorphe qui ne pouvait être éliminée par des cristallisations répétées.

Parmi les techniques utilisées, il y a la précipitation par différentes concentrations de sels (généralement des sulfates d'ammonium ou de sodium) ou de solvants (acétone ou éthanol), la dénaturation différentielle par la chaleur ou le pH, la centrifugation différentielle et l'électrophorèse.

L'adsorption sélective et l'élution des protéines au moyen des colonnes de cellulose échangeuses d'anions, la diéthylaminoéthyl-cellulose (DEAE cellulose) et des colonnes échangeuses de cations, la carboxyméthyl-cellulose (CM cellulose) ont donné de très bons résultats comme méthode de purification rapide et poussée. Finalement pour obtenir l'enzyme cristallisé , on utilise généralement une solution de sulfate d'ammonium.

PESCE et coll. (89) ont donné de très nombreux détails techniques concernant la préparation de nombreuses LDH d'origines très différentes. OKABE et coll (86) emploient pour la séparation des cinq isoenzymes de l'utérus, la chromatographie sur DEAE-cellulose d'un extrait purifié par relargage au sulfate d'ammonium, l'élution est notamment conduite avec un gradient concave de molarité croissante en chlorure de sodium (0,01 M $\longrightarrow$ 0,15 M) en tampon phosphate de pH 7.

B - Le poids moléculaire

De l'ensemble des données recueillies dans la littérature, on peut attribuer aux LDH un poids moléculaire voisin de 140 000 ; par exemple, pour la LDH du coeur humain $140\,000 \pm 4\,000$ [NISSELBAUM et BODANSKY (83)], pour la LDH du coeur de boeuf $150\,000 \pm 7\,500$ NEILANDS (81, 82) et pour l'enzyme du coeur de porc 127 000 [PFLEIDERER et JECKEL (92)]. Le poids moléculaire de la L-lactico-déshydrogénase de *Lactobacillus plantarum* est de 153 000 ; celui de la D-lactico-déshydrogénase du même microorganisme est plus petit [PESCE et coll. (89)]. Chaque sous-unité du tétramère possède un poids moléculaire voisin de 35 000 ou de 36 000 [APPELLA et MARKERT (4)].

C - Composition en acides aminés.

De nombreuses déterminations ont été faites [WACHSMUTH, PFLEIDERER et WIELAND (129), PESCE et coll. (90), PESCE et coll. (89)].

Pour les LDH de coeur et de muscle de boeuf, PESCE et coll. (89) donnent la composition suivante : lysine, histidine, arginine, valine, asparagine, thréonine, sérine, acide glutamique, proline, glycine, alanine, valine, méthionine, isoleucine, leucine, tyrosine, phénylalanine, cystéine et tryptophane.

Les compositions en acides aminés des LDH de coeur et de muscle de boeuf, c'est-à-dire d'un même organisme sont différentes. Dans certains cas, les différences sont très importantes.

Par contre, si l'on compare les compositions en acides aminés, soit de la LDH de coeur, soit de la LDH de muscle, appartenant à des espèces voisines, on peut trouver des analogies de compositions plus nettes (89).

D - Nombre de chaînes et extrémités terminales

En utilisant la méthode des dinitrophényl amino-acides, certains auteurs ont identifié la DNP-valine et l'acide DNP-glutamique.

Des études très précises ont été faites par STEGINK et WESTLING (118) à l'aide d'une microméthode enzymatique de détermination des groupes N-acétylés. Ces auteurs ont trouvé 7 à 8 moles d'acétate pour la LDH du coeur de boeuf. Pour la LDH du coeur de porc, MELLA et coll. (77) ont montré que la leucine était en position C terminale.

La lacticodéshydrogénase semble être formée de quatre chaînes peptidiques identiques et ayant un poids moléculaire de 36 000.

E - Sites actifs de l'enzyme.

1) La cystéine et la cystine.

Certains acides aminés comme la cystéine ou la cystine jouent un rôle essentiel. L'enzyme perd 90 à 97 p. 100 de son activité si on bloque par un réactif chimique approprié quatre seulement des groupes thiol de la molécule. On peut récupérer l'activité enzymatique de la LDH bloquée par un traitement à la cystéine, ce qui démontre la réversibilité de l'inhibition.

Le co-enzyme normal (NADH) et surtout le co-enzyme synthétique (3 - acétylpyridine-adénine-dinucléotide réduit) empêchent la liaison du p-chloromercuribenzoate sur les groupes thiol essentiels de l'enzyme. Les quatre groupes thiol essentiels sont donc impliqués dans la liaison avec le co-enzyme pyridinique [DI SABATO et coll. (108)].

Plusieurs groupes de chercheurs, ont tenté d'isoler la « séquence » qui porte le groupe thiol essentiel dans le monomère. FONDY et coll. (41) ont isolé, à partir de plusieurs LDH un « dodécapeptide ».

2) Interaction d'un résidu d'histidine.

WOENCKHAUS, BERGHAUSER et PFLEIDERER (151) ont trouvé qu'un second peptide était alkylé au niveau d'un noyau imidazole d'un résidu d'histidine. Après protection du groupe thiol essentiel par des ions mercuriques, l'enzyme est alkylé au niveau de ce second site. Après élimination des ions mercuriques, l'enzyme encore alkylé sur le résidu d'histidine ne récupère pas la totalité de son activité.

Le site actif de l'enzyme implique donc essentiellement deux acides aminés, un résidu de cystéine et un résidu d'histidine.

3) Rôle des résidus de tyrosine.

Des recherches ont permis d'observer que le coenzyme était incapable de se fixer sur la protéine isolée et par conséquent que les résidus de la tyrosine (ceux qui fixent l'iode) pourraient faire partie du site de liaison du coenzyme à la LDH.

F - Mécanisme du transport de l'hydrogène au niveau des lactico-deshydrogénases.

SCHELLENBERG (110), en réalisant des expériences avec du lactate tritié (lactate - 2 - ^3H) a trouvé que l'enzyme pouvait contenir 0,5 g d'atome de tritium pour 132 000 g de protéine. On isole le tryptophane tritié, le marquage se fait au niveau du groupe méthylénique de la chaîne latérale du résidu tryptophyl. Le mécanisme de la réaction fait intervenir une indolénine. De plus, la grande réactivité des indolénines avec les thiols permet de supposer qu'il existe une stabilisation de l'indolénine par un résidu de cystéine en position voisine dans la structure tertiaire de la molécule.

III - LA REACTION CATALYTIQUE

A - Spécificité.

1) Les substrats.

Les LDH cristallisées de coeur (82), de muscle (67) de foie de rat (47) de cerveau de boeuf partiellement purifiées (144) sont spécifiques du L (+) lactate. Il n'y a pas d'activité détectable avec le D (-) lactate, ni d'effet inhibiteur.

Certains auteurs ont prétendu que la LDH purifiée d'érythrocytes de lapin avait une action sur les formes L (+) et D (-) du lactate (88) PLAGEMANN et coll. (96) n'ont pas été capables de répéter cette observation et trouvèrent l'enzyme actif seulement sur le L (+) lactate.

DENNIS et KAPLAN (30) ont purifié à partir du *Lactobaccillus Plantarum* deux fractions enzymatiques. Elles dépendent du NAD pour leur activité et présentent un haut degré de spécificité envers le L (+) et le D (-) lactate.

MEISTER (74) a trouvé qu'une série d'acides linéaires en C₅, C₆ et C₇ et dicétoniques étaient réduits et le taux de réduction était environ un dixième de celui du pyruvate. Le phénylpyruvate et le p-hydroxypyruvate sont faiblement réduits, il en est de même pour les acides oxaloacétique et céto-glutamique. L'acide céto-glutarate n'est pas réduit par l'enzyme du coeur humain (83).

MARKERT et MOLLER (72) ont observé qu'une série d'acides hydroxylés étaient oxydés à différents degrés par les isoenzymes de l'extrait de coeur de boeuf et les taux relatifs d'action de chaque isoenzyme sur ces séries d'acides étaient constants.

De la HABA et coll. (52) ont utilisé la réduction catalysée par la L.D.H., sur l'hydroxypyruvate dans l'essai de cette substance, et KUN (68) a montré que le β 3 - mercapto pyruvate était réduit par la L.D.H. du coeur.

FRANK et HOLZ (43) ont rapporté que l'acide glyérique et un nombre de dérivés β - halogénés et β - aminés de l'acide lactique étaient oxydés par l'enzyme cristallisé de muscle de lapin. Le degré d'oxydation est environ égal au 1/100e de celui du lactate.

L'acide trichloracétique et l'acide 3 - phosphoglycérique sont inactifs. NEILANDS (81) rapporta que l'enzyme cristallisé de coeur de boeuf était inactif sur l'acétaldéhyde, l'acétone, la méthyl-éthyl cétone, la 3,6 diméthyl 2 - 5 dioxanedione, le méthyl-lactate et l'acide glycolique.

2) Le co-enzyme

MEHLER et coll. (73) ont montré que le nicotinamide-adénine-dinucléotide (NAD) était environ 170 fois plus actif que le nicotinamide-adénine-dinucléotide-phosphate (NADP) pour oxyder le lactate en présence d'enzyme purifié de muscle de lapin.

MEISTER (74) trouva que pour une série d'acides α - cétoniques le NADH₂ était 100 à 380 fois plus actif que le NADPH₂ avec l'enzyme de coeur de boeuf.

Dés études (147) ont montré que le NADPH₂ formait un complexe fluorescent avec l'enzyme de coeur de boeuf. L'intensité de la fluorescence était approximativement un cinquième de celle du complexe enzyme-NADH₂.

FUTTERMAN et KINOSHITA (44) rapportèrent qu'au contraire des autres LDH les cinq isoenzymes de la LDH de la rétine de boeuf étaient actifs en présence de NADH_2 , et de NADPH_2 . La concentration en pyruvate exigée pour l'activité maximale à pH 5,5 était dix à vingt fois supérieure lorsque le NADPH_2 était utilisé à la place du NADH_2 . Cependant l'inhibition du pyruvate n'était pas observée quand le NADPH_2 était le co-enzyme. Il a été suggéré qu'en présence de pyruvate, cet enzyme pouvait jouer un rôle dans l'oxydation anaérobie du carbone C_1 du glucose.

Les LDH de la cornée révélèrent une faible spécificité en ce qui concerne le NAD et le NADP (152).

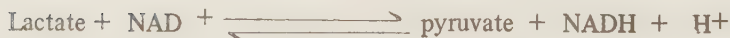
KARNES et coll. (63) étudièrent l'action de certains analogues du NAD avec l'enzyme du foie de rat. Le NAD, l'acétylpyridine-NAD, le pyridine-3-aldéhyde-NAD, les composés déamino correspondants et le dinicotinamide mononucléotide entier agissent comme co-enzyme et tous forment des complexes avec l'ion sulfhydryl.

L'éthyl nicotinate-NAD, l'iso-nicotinique hydrazide analogue du NAD, l'ADP ribose et l'acide adénylique sont de puissants inhibiteurs de la réaction enzymatique. Comme nous venons de le voir, la L (+) LDH animale est un enzyme nécessitant la présence de NAD. Elle est très différente des LDH des micro-organismes.

Les LDH isolées de la levure et de différentes bactéries appartiennent à un autre type d'enzyme. Pour la LDH de levure, les pyridine-nucléotides ne sont pas requis. Son comportement rappelle celui de la succino-déshydrogénase ou de la succinate-ubiquinone-réductase. L'enzyme est inhibé par les arsénites. Un enzyme voisin (lactique oxydase) contenant du flavine-adénine-dinucléotide (FAD) et oxydant le L. lactate en pyruvate en présence d'oxygène ou de bleu de méthylène a été isolé du *Mycobacterium phlei* (34).

B - La constante d'équilibre

La constante d'équilibre de la réaction :



a été déterminée par plusieurs chercheurs. KUBOWITZ et OTT (67) trouvèrent une valeur apparente à pH 7,40 de 6×10^{-5} à 22° . Ceci correspond à la constante d'équilibre réelle $2,4 \times 10^{-12}$. Ces auteurs remarquèrent que la constante d'équilibre apparente augmentait en même temps que la température et le pH. NEILAND (82) constata que la constante d'équilibre augmentait aussi avec la concentration en enzyme.

HAKALA et coll. (53) trouvèrent une valeur de $2,76 \times 10^{-12}$ pour la constante d'équilibre.

C - La cinétique

Des études antérieures sur les cinétiques de la réaction catalysée par la lactico-déshydrogénase s'accordaient toutes sur l'hypothèse que le co-enzyme et le substrat se liaient à des sites déterminés à la surface de l'enzyme (116, 111). Des mesures plus approfondies faites par HAKALA et coll. (53) avec la LDH de coeur de boeuf montrèrent que les vitesses initiales de chaque côté de la réaction réversible répondaient à des équations de la forme I et II.

$$V_f/v = 1 + K_o/O + K_l/L + K_{ol}/OL \quad (I)$$

$$V_r/v = 1 + K_r/R + K_p/P + K_{rp}/RP \quad (II)$$

Où V_f et V_r représentent les vitesses maximales de la réaction K_o , K_r et K_p les constantes de Michaelis du NAD oxydé, du lactate, du NAD réduit et du pyruvate et O, L, R, P respectivement les concentrations initiales de chacun des réactifs.

K_o et K_{rp} sont des constantes complexes de formule rappelant celle de la constante de Michaelis.

ALBERTY (1) a fait remarquer que les constantes d'équilibre et de cinétique étaient liées par les équations suivantes :

$$K = \frac{V_f K_{rp}}{V_r K_{ol}} \quad (III) \quad \text{et} \quad K = \frac{V_f^3 K_r K_p}{V_r^3 K_o K_l} \quad (IV)$$

HAKALA et coll. (53) ont conclu à partir des mesures des constantes d'équilibre et de cinétique à pH 6,80 aux températures comprises entre 15° et 35° que les constantes de cinétique satisfaisaient l'équation (III). WINER et SCHWERT (145) obtinrent de mêmes résultats aux pH compris entre 5,5 et 10,5.

D - Les inhibiteurs.

1) Inhibition due au substrat et à ses analogues.

KUBOWITZ et OTT (67) et d'autres (53, 81, 82, 145) ont montré que l'enzyme de coeur de boeuf était inhibé par de fortes concentrations de pyruvate. Cette inhibition a été aussi signalée pour la LDH du muscle de lapin (22), du foie de rat (47) du coeur (83) et du sérum humain (121).

Avec l'enzyme du coeur de boeuf, l'inhibition est fortement liée à la valeur du pH (145).

De nombreux travaux ont montré que seules les substances anioniques possédaient une action inhibitrice (146). La sensibilité du système de la LDH aux

effets des anions a été observée la première fois par GREEN et BROSTEAUX (51).

On a supposé que tous ces effets anioniques résultaient de la compétition entre les anions et le substrat pour un site déterminé de la surface de l'enzyme.

QUASTEL et WOOLDRIDGE (100) ont signalé, au début, l'inhibition d'une préparation enzymatique brute d'*Escherichia coli* par une variété d'acides carboxyliques tels que les acides glycoliques, oxaliques, tartroniques et mandéliques.

Plusieurs rapports confirmant ces observations avec la LDH de plusieurs origines ont été publiés depuis (22, 88, 146).

OTTOLENGHI et DENSTEDT utilisant l'enzyme d'érythrocytes de lapin constatèrent que le malonate et le tartronate étaient compétitifs du pyruvate et non du lactate (88).

L'inhibition par les acides α -mercapto a été signalée par CHAFFEE et BARTLETT (25) avec l'enzyme de muscle de lapin. Cependant l'action inhibitrice du mercapto-succinate, sur l'enzyme du muscle de lapin et sur la D (-) LDH du *Lactobacillus arabinosus* est diminuée d'une façon marquée ou complètement supprimée (30).

2) Inhibition due au co-enzyme et à des analogues.

Aucune inhibition de l'enzyme du muscle cardiaque de boeuf, à fortes concentrations de NADH₂ n'a été rapportée (53) mais avec l'enzyme du sérum humain THIERS et VALLEE (121) ont observé une inhibition aux concentrations de NADH₂ supérieures à 200 μ M.

L'inhibition par de fortes concentrations de NAD à pH 7 a été constatée avec l'enzyme de coeur de boeuf et de muscle de lapin (84).

ANDERSON et KAPLAN (3) ont essayé de nombreux analogues co-enzymatiques du NAD pour leur pouvoir d'inhiber la réduction du NAD avec l'enzyme du coeur de boeuf et du muscle de lapin.

L'analogue 3-benzoyl pyridine révéla une action inhibitrice non-compétitive avec le NAD et inhibait la réduction du pyruvate avec l'enzyme du coeur de boeuf. L'analogue thionicotinamide est compétitif du NAD avec l'enzyme du muscle de lapin.

VAN EYS et coll. (37) montrèrent que l'inhibition due au mercapto-succinate sur l'enzyme du muscle du squelette du lapin et la D-LDH du *Lactobacillus arabinosus* à forte concentration de lactate était plus importante avec l'analogue acétylpyridine du NAD qu'avec le NAD.

Avec l'enzyme du foie de rat, l'inhibition de la réduction du co-enzyme en présence de mercaptosuccinate est plus forte avec les analogues acétylpyridine et l'aldéhyde pyridinique du NAD.

3) Inhibition due aux composés non liés structuralement au substrat.

Le bisulfite forme un complexe ternaire avec les enzymes de coeur de boeuf, de muscle de lapin et le NAD, l'acétyl-pyridine. NAD ou le pyridine-3-aldéhyde-NAD. Avec l'enzyme de foie de rat, il n'en est pas de même (37).

Le bisulfite combiné à l'acétaldéhyde inhibe l'enzyme de muscle de lapin et l'inhibition est due probablement à la combinaison avec le substrat (155)

Le sulfure de sodium s'est révélé un puissant inhibiteur des enzymes de foie de rat mais non du coeur de boeuf ou du muscle de lapin et forme un complexe ternaire avec l'enzyme et le NAD ou son analogue (37).

Les enzymes de coeur de boeuf (81, 120) de coeur de porc, de muscle de rat et de lapin (93) sont inactivés lentement par le p. mercuribenzoate. Cette inhibition disparaît en présence de cystéine ou de glutathion. Ceci indique la participation de groupes thiol.

L'enzyme de coeur de boeuf a approximativement 4 radicaux thiol par molécule qui réagissent avec le p. mercuribenzoate pendant une heure et d'autres qui sont précisément moins réactifs (120).

L'acétylation inactive l'enzyme de coeur de boeuf et augmente la réactivité des radicaux thiol envers le p. mercuribenzoate (84).

Au contraire de l'inactivation lente de l'enzyme de coeur de boeuf par le p. mercuribenzoate, les sels de mercure et d'argent causent une inactivation rapide (120).

Les radicaux thiol de l'enzyme de coeur de boeuf ne réagissent pas avec l'o-iodosobenzoate, l'iodoacétate ou le N-éthylmaléimide (81). L'enzyme est cependant inactivé par l'iode (81).

DUBE et coll. (33) ont établi que l'inactivation de l'enzyme du muscle de lapin par l'iode était due en grande partie à l'oxydation des radicaux thiol.

Le traitement de l'enzyme de coeur de porc par le 2 - 4 - dinitrofluorobenzène cause une diminution de l'activité enzymatique. Cette perte d'activité est diminuée en présence de NAD et de sulfite (94). Le co-enzyme et ses analogues possèdent une action protectrice de la LDH contre les agents dénaturants (93) et la protéolyse (64).

CHAPITRE II

QUELQUES ANTI-INFLAMMATOIRES NON STEROIDIQUES

I - L'INDOMETACINE.

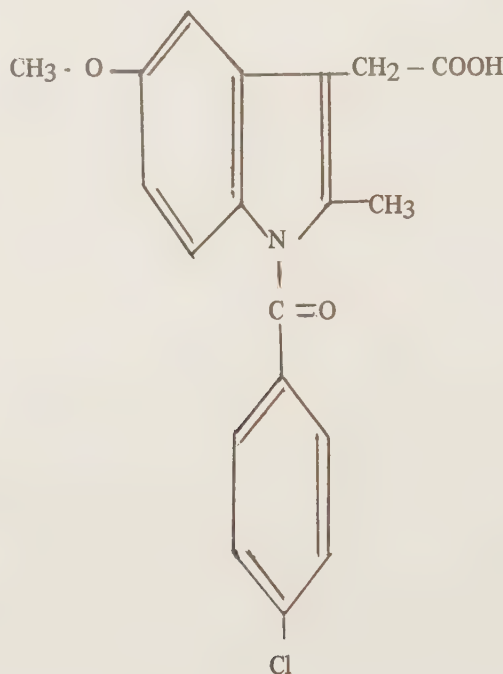
Mise à l'épreuve dans certains centres médicaux dès octobre 1962, l'Indométacine, anti-phlogistique non stéroïdique dérivé de l'indole, a suscité partout un intérêt immédiat et légitime. Synthétisée par SHEN et collaborateurs à l'institut Merck de recherches thérapeutiques, l'indométacine possède, en effet, des propriétés anti-inflammatoires remarquables sur le plan expérimental.

Si l'intérêt éveillé par la découverte de ce nouvel agent thérapeutique s'est révélé d'emblée aussi unanime, cela tient à plusieurs causes. L'Indométacine est entrée dans le monde des rhumatologues au moment où l'enthousiasme qu'avaient soulevé les cortisonés, quinze ans auparavant, s'était déjà bien tempéré à mesure que l'on découvrait les méfaits de l'hormonothérapie au long cours. De même, on commençait à se rendre compte que l'emploi prolongé des anti-malariques de synthèse dans le traitement de la polyarthrite chronique évolutive n'était pas si anodin que l'on avait bien voulu le croire au début et qu'il était grevé, notamment du risque majeur de déclencher une rétinopathie grave et irréversible. En second lieu, l'Indométacine était le premier agent anti-inflammatoire non stéroïdique depuis la découverte de la phénylbutazone quelques dix ans auparavant dont la puissance pouvait rivaliser avec et même surpasser celle des pyrazolés en ce qui concerne l'expérimentation animale.

1 - Nature

L'Indométacine est une molécule de synthèse choisie parmi 350 dérivés de l'indole. Les publications lui donnent habituellement le nom chimique de : 1 - (p. chlorobenzoyl) -5-méthoxy-2 méthylindole-3 acide acétique.

Si l'on désire insister sur sa filiation avec l'indole, on peut aussi le dénommer, comme COSTE et collaborateurs l'ont fait : N (p. chlorobenzoyl)-5 méthoxy-2 méthyl-3 éthanoyl-indole.



N (p. chlorobenzoyl)-5-méthoxy-2 méthyl-3 éthanoyl-indole

- sa formule brute est : $C_{19}H_{16}NO_4Cl$
- son poids moléculaire est de 357,78

Elle se présente comme une poudre blanc jaunâtre dont le point de fusion est situé entre 156 et 160° C. Elle est soluble dans l'alcool, l'acétone, le dichloréthylène, insoluble dans l'eau et les hydrocarbures, stable à l'état de poudre, elle se dénature rapidement en solution alcaline et à la lumière.

2 - Actions.

- Action anti-inflammatoire

C'est la plus remarquable. Cette action a été tout d'abord mise en évidence chez l'animal par la mesure de la propriété qu'elle a d'inhiber la formation du granulome ou l'œdème engendrés par l'injection sous plantaire de carragénine chez le Rat. Il semble y avoir une bonne corrélation avec ce que l'on observe chez l'Homme quant à l'activité anti-inflammatoire. Des déterminations comparatives ont montré que l'Indométacine était plus puissante que l'acide acétylsalicylique, que la phénylbutazone ou que l'hydrocortisone, les rapports d'activité variant suivant le test utilisé.

- Action anti-pyrétique

Elle apparaît particulièrement marquée chez le Lapin. Elle est dix fois plus puissante que celle de la phénylbutazone et soixante dix fois plus que celle de l'aspirine chez le Rat. La durée d'action de cette activité antipyrétique est plus prolongée que celle de l'amidopyrine, comparable à celle de la phénylbutazone (150).

- Action analgésique.

Plus difficile à mettre en évidence chez l'animal, elle est moins marquée qu'avec les autres anti-inflammatoires, mais cependant quinze à vingt fois supérieure à celle de l'aspirine et de l'amidopyrine.

3 - Mécanisme d'action.

Il est encore mal précisé. On ne peut que signaler un certain nombre de faits négatifs.

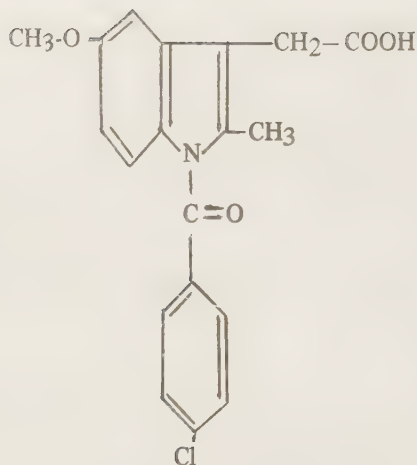
- le produit n'agit pas par un mécanisme antihistamine, ni anti-sérotonine, car il n'agit pas sur les manifestations morbides engendrées par l'une ou l'autre (148, 150) de ces substances.

Il n'agit pas par l'intermédiaire du couple hypophyso-surrénalien car il agit aussi bien sur le rat surrénalectomisé que sur le rat intact. Et par ailleurs, son administration même prolongée n'entraîne pas d'involution thymique, lymphatique ou surrénale.

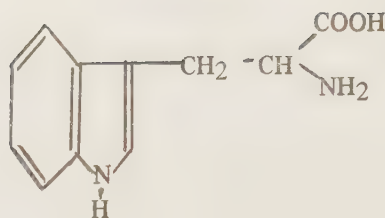
- L'indométacine n'a aucune action sur le système nerveux central, ni sur les systèmes sympathiques et parasympathiques (26).

On a supposé qu'un mécanisme d'action pourrait consister en un déplacement du cortisol de ses protéines fixatrices au sein du plasma, ce qui ferait pénétrer le corticoïde dans les tissus.

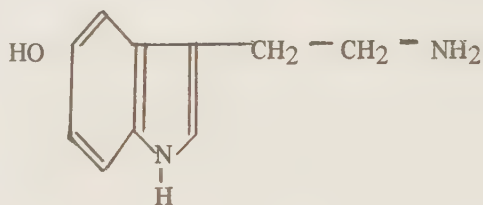
Remarque : Rapprochement avec le tryptophane et la sérotonine.



Indométacine



Tryptophane



Sérotonine

La parenté de l'Indométacine avec le tryptophane d'une part et avec la sérotonine de l'autre, est évidente.

Comme le tryptophane, l'Indométacine dérive de l'Indole avec une chaîne latérale en 3 ; comme la sérotonine, elle possède un groupe méthoxy en 5 qui paraît avoir de l'importance.

Rappelons, sans tirer de conséquences, qu'on a mis en évidence dans la maladie rhumatoïde, des troubles du métabolisme du tryptophane avec augmentation de l'excrétion de l'acide 3 hydroxy-anthranilique qui en dérive (MAC MILLAN, BETT).

Il est plus intéressant de faire un rapprochement avec la sérotonine car les troubles toxiques résultent sans doute de propriétés apparentées à celles de cet intermédiaire biochimique.

4 - Toxicité

- Toxicité aiguë :

Par voie orale, la DL 50 est chez la souris et le rat, respectivement de 50 mg/kg et de 10 mg/kg soit un rapport :

$$\frac{\text{Dose thérapeutique}}{\text{DL}_{50}} = 10 \text{ à } 20$$

Chez le Lapin, la DL₅₀ orale est de 135 mg/kg.

Par voie intra-péritonéale, la DL₅₀ est de 28 mg/kg chez la souris et par voie intra-veineuse, elle est de l'ordre de 40 mg/kg.

- Toxicité chronique.

Dans la plupart des espèces animales, la tolérance n'est pas supérieure à 1 mg/kg en une seule prise, mais s'élève à 3 mg/kg par 24 h à condition de fractionner la dose en trois ou quatre prises de préférence en administrant le produit en même temps que les aliments.

Les manifestations de toxicité chronique sont, avant tout, d'ordre digestif, ulcération gastrique, hémorragies intestinales. Ces atteintes sont moins fréquentes qu'avec les corticoïdes.

A dose très forte, l'indométacine peut inhiber chez le Rat, la réabsorption de l'eau et du chlorure de sodium.

On a également signalé chez certains animaux soumis à des doses fortes, une baisse de l'hématocrite (en dehors de toute hémorragie digestive) et des perturbations de la formule leucocytaire (hyperleucocytose) analogues à celles que produisent les autres anti-inflammatoires non stéroïdiques.

On n'a pas noté de toxicité hépatique, ni d'atteinte plaquettaire. Il n'existe pas d'effets tératogènes constatés sur plusieurs générations de rats ou de lapins, ni d'anomalies du cycle reproducteur (26).

5 - Métabolisme.

Par voie orale, l'absorption est rapide. La concentration maximale est obtenue une demi-heure à deux heures après la prise (7,5 à 10 µg/ml après une prise de 100 mg). Le taux sanguin s'abaisse progressivement et atteint une valeur négligeable en 7 à 8 heures.

Par voie rectale, la même dose entraîne des taux plus variables en raison d'une absorption plus ou moins régulière par la muqueuse rectale. Le taux sanguin maximal est moins élevé (5 µg/ml) mais la concentration plasmatique est plus étalée et persiste plus longtemps à un taux efficace (dix heures environ).

Le produit se retrouve inchangé dans le sang, lié aux protéines plasmatiques. Chez l'Homme, l'élimination se fait pour les deux tiers par les urines, sous forme de dérivés glycuco-conjugués. Le reste est éliminé non modifié par voie intestinale. Il ne semble pas y avoir d'accumulation du produit (26).

Chez le Lapin, une certaine quantité d'Indométacine est métabolisée par désacétylation ou déméthylation et les métabolites sont excrétés dans les urines tels quels sous forme glycuco-conjuguée (58).

Excrétion fécale et urinaire de radioactivité chez le Rat, le Lapin et l'Homme à la suite d'une administration orale d'Indométacine marquée au C 14.

Temps Heures	Pourcentage des doses excrétées					
	Rat		Lapin		Homme	
	Urine	Fèces	Urine	Fèces	Urine	Fèces
24	36,7 ± 2,0	19,1 ± 7,1	53,8 ± 11,7		54,3 ± 5,1	19,0 ± 9,9
48	7,4 ± 0,6	24,7 ± 2,8	21,1 ± 3,3			
72	0,8 ± 0,1	3,9 ± 1,8				5,3 ± 2,6
96			4,2 ± 1,4	4,8 ± 0,2		
120						
Total	44,9	47,7	79,1	4,8	54,3	24,3

VI - INDICATIONS THERAPEUTIQUES

Les indications principales sont :

- Les rhumatismes inflammatoires et en particulier :
 - la polyarthrite chronique évolutive
 - la spondylarthrite ankylosante
 - le rhumatisme psoriasique
- Les rhumatismes dégénératifs comprenant les arthroses de diverses articulations en particulier, les coxarthroses
- La goutte
- Les affections para-articulaires, tendinites, synovites, bursites, épicondylites, périarthrites scapulo-humorales, rachialgies et radiculalgies.
- Contre-indications : les ulcères gastro-duodénaux
les asthmatiques sensibles à l'acide acétylsalicylique.

VII - RESULTATS BIOLOGIQUES

Les effets de l'Indométacine sur les signes biologiques des maladies rhumatismales sont des plus restreints.

La vitesse de sédimentation n'est pratiquement pas modifiée. Certains auteurs font état d'un abaissement modéré, statistiquement non significatif.

Il en est de même des tests sanguins : réactions de Waaler-Rose, test au latex qui ne sont négativés, même par un traitement prolongé.

Il existe un contraste frappant entre cette inactivité biologique et le succès thérapeutique souvent indiscutable. Ainsi, se confirme le caractère symptomatique et non curatif de l'action de cet anti-inflammatoire.

Par ailleurs, les taux de la glycémie, des transaminases et de la phosphatémie ne sont pas modifiés par le traitement.

VIII - CONCLUSION

L'Indométacine a pris une place importante dans les thérapeutiques anti-inflammatoires. Certes, elle n'a pas une activité aussi constante que les corticoïdes et sa tolérance n'est pas toujours excellente.

Les incidents de traitement sont assez fréquents, mais rarement sérieux. Il semble en particulier, que le risque digestif qui est réel soit moindre qu'avec les corticoïdes. Il s'agit d'une indication symptomatique qui n'influence pas le syndrome biologique et son arrêt peut conditionner une rechute véritable. Son association avec les corticoïdes est particulièrement intéressante, en permettant de diminuer la posologie de ces derniers et par la même, la fréquence et la gravité des effets secondaires d'une cortico-thérapie prolongée (26).

II - L'OXYPHENBUTAZONE

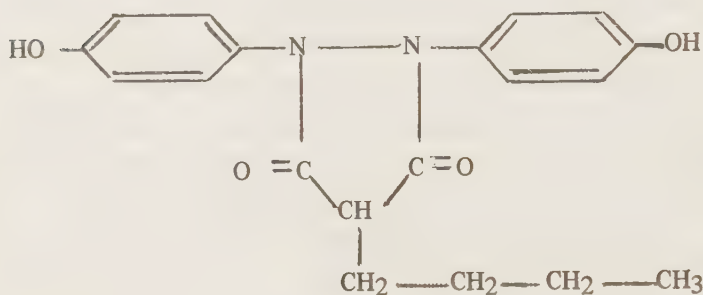
L'oxyphenbutazone est le métabolite hydroxylé de la pyrazolidine, cette substance isolée pour la première fois par BURNS et BRODIE de l'urine de malades traités par la phénylbutazone s'est montrée dotée de puissantes propriétés anti-inflammatoires et anti-pyrétiques. Ce corps fut synthétisé par les Laboratoires Geigy.

Utilisé depuis plusieurs années dans de nombreux pays, cette substance, en France, est d'apparition récente par rapport à son homologue, la phénylbutazone.

1 - NATURE

L'oxyphenbutazone est le :

Monohydrate de la 1-phényl-2-(p-hydroxyphényl)- 3,5-dioxo-4-n-butyl-pyrazolidine



L'oxyphenbutazone est une substance blanche cristalline, à fonction acide, soluble dans divers solvants organiques (alcool éthylique, chloroforme, benzène et éther). Le sel sodique est facilement soluble dans l'eau. Le point de fusion des cristaux hydratés est de l'ordre de 96°.

2 - ACTIONS

Action anti-inflammatoire :

Elle fut déterminée qualitativement et quantitativement sur divers phénomènes phlogistiques créés expérimentalement chez l'animal.

Action antipyrétique :

Elle a été étudiée sur la fièvre déclenchée chez le rat par l'injection sous-cutanée d'une suspension de levure.

L'action antithermique de l'oxyphenbutazone est pratiquement analogue en durée et en intensité à celle de l'amidopyrine (32).

Action antalgique :

Elle fut recherchée à l'aide de diverses techniques qui ont permis de mettre en évidence la remarquable action antalgique de quelques dérivés pyrazolés classiques.

Méthode de GORDONOFF : excitation de la pulpe dentaire du lapin.

	Administration	Dose mg/kg	Elévation du seuil de stimulation %
Phénylbutazone	I.V.	50	18
		75	40
		100	40
	orale	600	25
Oxyphenbutazone	I.V.	20	5
		30	16
		50	

Aucune action similaire ne fut retrouvée avec l'oxyphenbutazone, seule la méthode de la « Hot-Plate » fit ressortir un certain effet analgésiant insuffisant pour reconnaître au médicament une action antalgique centrale utilisable en thérapeutique. (141)

3 - MECANISME D'ACTION

En principe, l'effet anti-inflammatoire ne dépend pas d'une stimulation hypophyso-surrénalienne ; il ne s'explique que partiellement par l'inhibition de la dégradation endogène des glucocorticoïdes. C'est ainsi que contrairement aux corticoïdes, il ne détermine pas une glycogénolyse hépatique. Son action antalgique résulte de ses propriétés anti-inflammatoires.

4 - TOXICITE

Toxicité aiguë :

La détermination de la DL₅₀ chez la souris, le Rat et le Lapin (32) après administration intraveineuse (une injection suivie de 8 jours d'observation) ou administration orale (une seule prise suivie de 14 jours d'observation) a donné les chiffres suivants :

Administration	DL 50 Souris mg/kg	DL 50 Rat mg/kg	DL 50 Lapin mg/kg
Intraveineuse	52	68	104
per os	480	980	

Des études comparatives de la DL₅₀ entre la phénylbutazone et son métabolite I, ont montré une toxicité plus faible de l'oxyphenbutazone.

DL 50	Lapin mg/kg	Souris		Rat	
		I.V.	Orale mg/kg	I.V. mg/kg	Orale
Phénylbutazone	146	42	680	150	1280
Oxyphenbutazone	104	52	480	68	980

Toxicité subchronique :

Les essais ont porté sur des groupes de 10 à 20 rats.

Le médicament était administré une fois par jour, sauf le dimanche pendant 4 semaines par sonde oesophagienne à la dose suivante :

- Groupe I - 1/8 de la DL 50 Orale
- Groupe II - 1/4 de la DL 50 Orale
- Groupe III - 1/2 de la DL 50 Orale

Tous les animaux survécurent à la dose de 125 mg/kg ; 80 % supportèrent une posologie de 250 mg/kg et 25 % : 500 mg/kg (141).

V - METABOLISME

L'oxyphenbutazone est presque complètement résorbé dans le tube digestif. Les taux plasmatiques mesurés chez 12 malades recevant chaque jour 800 mg (4 prises de 200 mg) ont montré des valeurs croissantes pendant les 3 premiers jours puis une stabilisation.

Les concentrations sanguines réalisées furent de 8 à 16,2 mg p. cent (154).

Malgré sa structure phénolique, l'oxyphenbutazone est extrêmement stable. La période biologique de demi-vie est de 48 à 72 heures chez l'Homme, de 8 heures chez le Rat, de 4 à 5 heures chez le lapin. (55, 153).

Dans le sang, l'oxyphenbutazone se combine aux protéines plasmatiques. Une concentration de 5 à 15 mg p. cent témoigne de la liaison de 98 % environ de la substance administrée. (154)

6 - RESULTATS BIOLOGIQUES

Les résultats sont assez disparates et il semble par exemple que la vitesse de sédimentation soit très inégalement influencée par cette substance.

Des contrôles hématologiques : numération globulaire, formules sanguines, ont montré que les résultats étaient superposables avant et après traitement.

7 - INDICATIONS THERAPEUTIQUES

Les indications principales sont :

Les inflammations et les oedèmes post-traumatiques : luxation entorse ,contusion fracture.

Les inflammations non traumatiques de l'appareil locomoteur : ténosynovite, bursite, myosite, névrite, inflammation rhumatismale.

Les inflammations et les oedèmes post-opératoires : amygdalectomie, interventions odontologiques, chirurgie plastique.

Les inflammations gynécologiques : annexie, salpingite, paramétrite.

Les inflammations oculaires : uvéite, iridocyclite, kératite, chorioretinite.

Les inflammations de vaisseaux sanguins et lymphatiques : thrombophlébite superficielle, lymphangite.

Les inflammations au cours des maladies infectieuses (adjuvant du traitement spécifique) pneumopathie aiguë, pleurésie, angine, zona.

8 - CONTRE-INDICATIONS

Les ulcères gastriques et intestinaux même anciens et considérés comme guéris constituent des contre-indications formelles. Une hypersensibilité primitive aux dérivés pyrazolés, une leucopénie, une diathèse hémorragique représentent des contre-indications.

Les troubles cardiaques, hépatiques, ou rénaux doivent imposer la prudence. Toute insuffisance grave de l'un de ces organes interdit un traitement par l'oxyphenbutazone.

9 - CONCLUSION.

L'oxyphenbutazone trouve en fait, ses meilleures indications dans tous les cas où la douleur et le blocage sont liés à des phénomènes inflammatoires.

Ce produit déjà bien connu et utilisé, se confirme par son efficacité et sa bonne tolérance. Il sait garder une place de choix dans l'arsenal thérapeutique des affections rhumatologiques.

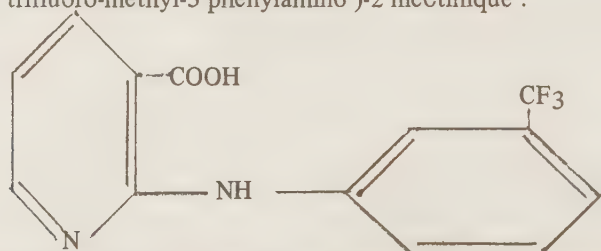
III - L'ACIDE NIFLUMIQUE

L'acide niflumique appartient à un nouveau type d'anti-inflammatoire. C'est un dérivé de l'acide anthranilique.

L'activité pharmacologique de l'acide anthranilique a été étudiée au début de ce siècle et une action antalgique faible a été mise en évidence chez l'animal.

En 1966, HOFFMANN et FAURE (57) présentent un travail consacré à l'étude des dérivés nouveaux préparés à partir d'un isostère de l'acide anthranilique, l'acide amino-2-nicotinique. La notion d'isostérie implique que les 2 composés ont une structure spatiale analogue ; dans l'acide amino-nicotinique, un azote a remplacé un carbone du cycle benzénique. L'acide niflumique possède donc 2 noyaux, l'un nicotinique, l'autre benzénique et c'est sur ce dernier qu'est fixé le radical trifluorométhyl.

Acide (trifluoro-méthyl-3 phénylamino)-2 nicotinique :



L'acide niflumique se présente sous l'aspect d'une poudre blanchâtre. Les activités anti-inflammatoires et analgésiques ont été clairement montrées chez le rat par BOISSIER, FICHELE, PAGNY et HORAKOVA (17).

1 - ACTIONS.

Action anti-inflammatoire : L'action anti-inflammatoire semble s'exercer à tous les stades de l'inflammation. D'excellents résultats ont été obtenus aussi bien sur les œdèmes provoqués chez le Rat que sur les pleurésies et péritonites.

Dans tous les cas, l'action est au moins égale et souvent supérieure à celle obtenue avec la phénylbutazone.

Action antipyrétique : On provoque une hyperthermie chez le Rat par injection sous-cutanée d'une suspension de levure. La température rectale est enregistrée à intervalles réguliers après administration du médicament.

L'action antipyrétique augmente avec la dose de médicament ; c'est un antipyrétique médiocre.

Action antalgique : L'étude systématique des propriétés de l'acide niflumique a conduit à rechercher son activité antalgique.

La convergence des différents résultats obtenus sur les tests pratiqués ont confirmé que l'acide niflumique développait une action analgésique propre.

REMARQUE : Relation - structure-activité.

BOISSIER, LWOFF et HERTZ (18) ont tenté de dégager les différences pharmacologiques en fonction de la structure chimique et de l'activité pharmacologique.

BOISSIER, FICHELE, PAGNY et HORAKOVA (17) ont signalé que l'amidification ou l'estérification de la fonction acide provoquait l'effondrement des propriétés anti-inflammatoires.

La décarboxylation de l'acide niflumique (18) laisse persister, atténuées certaines propriétés anti-inflammatoires mais les propriétés antalgiques sont supprimées, comme avec la diphénylamine qui conserve une forte activité antagoniste de l'érythème aux ultra-violets.

Si la structure diphénylamine est dissimulée dans un noyau phénothiazine comme l'acide métiazinique, que nous étudions plus loin, on retrouve les propriétés pharmacologiques de l'acide niflumique.

Les structures anthraniliques et benzaminopyridines sont donc des supports très solides d'activité anti-inflammatoire.

2 - MECANISMES D'ACTION.

Selon WHITEHOUSE et SKIDMORE (131) on peut attribuer à ces médicaments des propriétés inhibitrices, sur les réactions de biosynthèse de l'A.T.P., de biosynthèse de l'histamine et de la sérotonine (115) d'hydrolyse des protéines ou des esters amino-acides par des enzymes analogues à la trypsine.

Ce groupe de réactions apparemment hétérogènes possède un mécanisme biochimique partiellement commun qui nécessite la présence de radicaux amino-lysines libres.

Les anti-inflammatoires acides se combineraient aux groupements aminolysines de protéines enzymatiques ou du substrat, bloquant les réactions de synthèse. Il y a ainsi découplage de la phosphorylation oxydative et arrêt de la synthèse de l'A.T.P., inhibition de l'histidine décarboxylase et des enzymes hydrolysant les peptides.

L'inhibition de la synthèse de l'A.T.P. a notamment comme conséquence, un arrêt de la formation des sulfates de mucopolysaccharides. Cette inhibition constitue probablement l'un des facteurs à envisager pour expliquer l'action ulcérogène expérimentale commune à toutes ces substances.

Enfin, l'érosion des cartilages de conjugaison par les enzymes protéolytiques est supprimée.

3 - TOXICITE

1) Toxicité aiguë :

Chez la Souris, le Rat, le Cobaye et le Chien, les animaux provenant d'élevages homogènes, l'acide niflumique administré par voie buccale, intra-veineuse et intra-péritonéale a donné les résultats suivants :

D L 50 48 heures	Voie orale mg/kg	Voie intra-péritonéale mg/kg	Voie intra-veineuse mg/kg
RAT	650	100	—
SOURIS	455	200	152

Dose minimum mortelle	Perfusion intra-veineuse lente
Cobaye	174 mg/kg
Chien	On ne commence à observer des morts d'animaux qu'à partir d'une dose considérable : 2 000 mg/kg

2) Toxicité chronique :

- Administré par voie orale pendant trois mois :
 - chez le Rat aux doses de 10, 25 et 50 mg/kg
 - chez le Chien à la dose de 250 mg/kg/jour

L'acide niflumique :

- n'a pas perturbé la croissance des animaux
- il n'a été relevé :
 - aucune atteinte rénale ou hépatique, pas de modification de constantes biologiques.
 - aucune répercussion sur les organes hématopoïétiques, pas de perturbations sanguines.
 - aucune action centrale, pas de modification aux tests de comportement
 - aucune lésion organique, pas d'altérations histologiques
 - et surtout aucune nécrose ou atrophie de la muqueuse gastrique.

Chez l'Homme, la tolérance digestive est bonne , surtout pour un anti-inflammatoire puissant : les troubles observés étant essentiellement à type de gastralgies ou de diarrhées.

Ces troubles disparaissent avec l'arrêt du traitement et ils peuvent le plus souvent être évités ou réduits par la prise du produit aux repas par l'association avec un muco-protecteur ou la réduction de la posologie.

3) Tératologie :

Administré à trois espèces animales, rats, souris, lapins, l'acide niflumique n'a induit :

- ni malformations
- ni anomalies constitutionnelles, aussi bien chez le fœtus prélevé par césarienne que chez les petits conservés jusqu'à maturité.

4 - METABOLISME :

Le métabolisme de l'acide niflumique a été étudié chez le Rat et la Souris. On a utilisé de l'acide niflumique marqué au C₁₄. Administré à la dose de 50 mg/kg le taux sanguin est de 75 mcg/ml., après le première heure et de 6 mcg/ml après 24 heures: Le produit est à peu près complètement lié aux protéines plasmatiques. Le foie retient après une heure 4 % de produit injecté, l'estomac 0,5 % et quelques traces ont été détectées dans le cerveau.

La technique d'autoradiographie chez la souris, après administration du produit par os et I.P. confirme ces résultats.

La radioactivité éliminée dans l'urine est à peu près de 2 % de la dose injectée après 1 heure, atteint 30 % à la 12ème heure et est pratiquement complète après 24 heures. La radioactivité trouvée dans les fèces est généralement de l'ordre de 0,01 %.

Aux doses thérapeutiques administrées par voie I.P. chez le rat, la demi-vie du produit est de 3 heures.

La chromatographie a permis de mettre en évidence cinq catabolites. La plus grande partie de l'acide niflumique éliminé, se retrouve sous forme glycuconjuguée. Un des catabolites correspond à l'acide 2 amino-nicotinique.

Indications thérapeutiques.

Les principales indications sont les suivantes :

- Rhumatismes inflammatoires :

- Polyarthrite chronique évolutive
- Spondylarthrite ankylosante
- Rhumatismes psoriasiques.

- *Rhumatismes dégénératifs :*

Coxarthroses, lombarthroses

- *Pathologie péri-articulaire :*

Sciaticques, lumbagos, névralgies cervico-brachiales, périarthrites scapulo-humérales

- *Différents processus inflammatoires et algiques :*

Phlébites, périphlébites, strumite, lupus érythémateux disséminé, goutte, myélomes, Paget.

- *Rééducations fonctionnelles :*

En rhumatologie, en orthopédie.

Résultats biologiques :

De nombreuses observations ont permis de suivre la vitesse de sédimentation, la fibrinémie, la C-Réactive-Protéine et les alpha-2 globulines.

Les trois dernières constantes sont améliorées d'une façon très nette. Il n'en est pas de même pour la vitesse de sédimentation, mais dans l'ensemble, les résultats sont satisfaisants.

L'hémogramme n'est pas modifié, aucune perturbation notable des lignées rouges et blanches ne fut décelée.

Les bilans d'exploration des fonctions rénales et hépatiques ne mirent en évidence aucune perturbation significative.

5 - TOLERANCE ET CONTRE-INDICATIONS :

Il n'a été observé :

- ni céphalées, ni retentissement sur le caractère, l'humeur et le sommeil
- aucune incidence sur le métabolisme hydro-sodé
- aucune répercussion sur les glandes endocrines, les organes hématopoïétiques et le parenchyme hépatique.

La tolérance digestive de l'acide niflumique est bonne pour un anti-inflammatoire puissant, les troubles observés étant essentiellement à type de gastralgies ou de diarrhées. Ces troubles disparaissent à l'arrêt du traitement. Ils peuvent être le plus souvent évités ou réduits par la prise de l'acide niflumique aux repas, par l'association avec un muco-protecteur ou la réduction de la posologie.

Chez les malades ayant des antécédents digestifs, l'utilisation de l'acide niflumique s'entourera d'une surveillance clinique attentive.

Dans les techniques de la péritonite expérimentale de BUCHER (21) et de l'arthrite chez le Pigeon (13), techniques dans lesquelles il est difficile de faire la part qui revient à l'activité anti-inflammatoire et celle qui revient à l'activité analgésique, l'acide métiazinique se montre respectivement égal ou un peu supérieur à la phénylbutazone.

Dans les techniques dans lesquelles l'acide métiazinique a été comparé à l'indométacine, il s'est montré 2 à 3 fois plus actif (érythème aux U.V.) soit environ 6 fois moins actif (abcès et oedème à la carrageenine) que ce dernier produit vis-à-vis de la polyarthrite par adjuvant chez le Rat, les doses actives d'acide métiazinique sont nettement plus élevées que celle d'indométacine, mais compte tenu de leurs toxicités respectives, les deux produits apparaissent comme équivalents.

L'activité anti-inflammatoire de l'acide métiazinique s'exerce aussi bien sur les phénomènes cellulaires que sur les phénomènes vasculaires (oedèmes, exsudat, érythème) de la réaction inflammatoire.

- Action antipyrétique

L'acide métiazinique exerce une activité antipyrétique vraie à la dose de 100 mg/kg p.o. chez le Rat. Il est dépourvu d'activité hypothermisante chez le rat normal. (62)

L'activité antithermique est environ 2 fois plus forte que celle de la phénylbutazone et 2 fois plus faible que celle de l'indométacine

- Action analgésique

L'acide métiazinique exerce une activité analgésique voisine de celle de la phénylbutazone et il est environ 40 fois moins actif que l'indométacine. (62)

3 - MECANISME D'ACTION

Le fait que ce produit présente la même activité anti-inflammatoire en présence ou en l'absence des surrénales (62) tend à montrer que son action s'exerce sans mise en jeu de l'axe hypophyso-surrénalien, par une action directe sur les tissus inflammatoires eux-mêmes, comme dans le cas de la phénylbutazone et de l'indométacine. Un argument supplémentaire à l'appui de cette hypothèse réside dans le fait que, étudiés chez le raton à l'aide de la technique de SHEWEL (114), l'acide métiazinique et la phénylbutazone ne provoquent pas l'involution du thymus.

4 - TOXICITE

- Toxicité aiguë et toxicité subaiguë (61)

Aux doses toxiques, les rats et les souris meurent par arrêt respiratoire. Aux doses subtoxiques, les souris sont déprimées et dyspnéïques.

6 - CONCLUSION

L'acide niflumique possède en clinique une activité anti-inflammatoire qui correspond à son activité biologique. L'activité antalgique est réelle, vérifiable reproductible et quasi-constante.

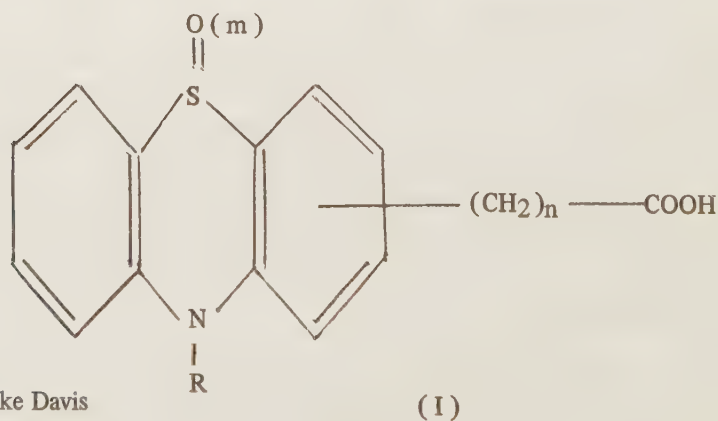
L'acide niflumique est parfaitement toléré sur le plan général, cutané et sanguin, mais il peut dans un certain nombre de cas, occasionner quelques troubles digestifs passagers.

Associé aux corticoïdes, l'acide niflumique permet dans nombre de cas, de réduire la corticothérapie.

IV - L'ACIDE METIAZINIQUE 16.091 RP

Les dérivés basiques de la phénothiazine ont été particulièrement étudiés depuis une vingtaine d'années (128) et nombre d'entre eux ont trouvé une application en thérapeutique dans les domaines très divers : allergie, migraines, toux, maladie de Parkinson, spasmes d'origines diverses, vomissements, douleurs, anesthésie potentialisée et surtout maladies mentales.

Mais les données tant chimiques que biologiques concernant les acides carboxyliques dérivés de la phénothiazine sont peu nombreuses. Par analogie avec les anti-inflammatoires possédant une fonction acide, tels que l'acide méfénamique*, l'acide niflumique** et l'indométacine *** il a été préparé dès 1964 les phénothiazines de formule générale (I) afin d'étudier leurs propriétés pharmacologiques et en particulier leur activité anti-inflammatoire (38).



* Ponstyl Parke Davis

** Nifluril UPSA

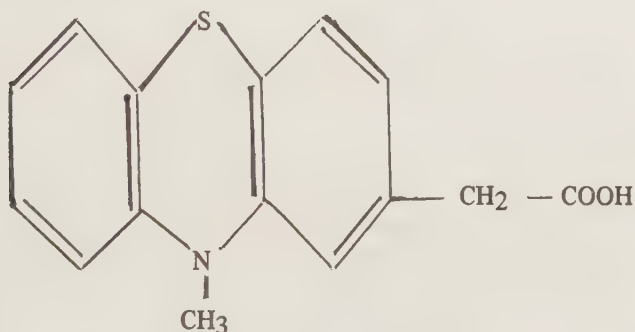
*** Indocid Merck

Il a été étudié l'influence de la position et de la longueur de la chaîne acide, du substituant à l'azote et du degré d'oxydation du soufre sur les propriétés, anti-inflammatoires de ces composés (78).

L'activité anti-inflammatoire des acides carboxyliques dérivés de la phénothiazine est surtout significative lorsque le substituant sur le noyau phénothiazinique est une chaîne acétique. Le maximum de cette activité apparaît pour une substitution en position 2 de la phénothiazine. La nature du substituant sur l'azote est également importante et le produit le plus actif est obtenu lorsque l'azote est substitué par un méthyl.

1 - NATURE

L'acide métiazinique répond à la formule suivante :
c'est l'acide (méthyl - 10 phénothiazinyl - 2) acétique :



Ce produit donne des sels solubles dans l'eau avec les bases fortes ; il est extractible par les solvants organiques en milieu acide et il réagit aux réactifs habituels des dérivés de la phénothiazine. Comme ces derniers, il est sensible à l'oxydation et à la lumière.

2 - ACTIONS

- Action anti-inflammatoire : (62)

L'acide métiazinique a montré une activité anti-inflammatoire nette dans la plupart des modèles expérimentaux utilisés.

Dans les techniques de l'abcès (12) et de l'oedème (149) à la carrageénine et dans celle de l'érythème aux U.V. (142), l'acide métiazinique est 2 à 4 fois plus actif que la phénylbutazone. Dans la technique de la poche granulomateuse de Selye (112), il exerce une activité voisine de celle de ce dernier produit.

Dans la technique de la polyarthrite par adjuvant (29) chez le Rat l'acide métiazinique exerce une activité nette qui semble un peu supérieure à celle de la phénylbutazone.

Les toxicités aiguës chez la souris et le rat, et la comparaison entre l'acide métiazinique, la phénylbutazone et l'indométacine sont résumées dans le tableau suivant :

Technique	Espèce	Voie	DL ₅₀ et limites fiducielles ($p = 0,5$) mg/kg		
			Acide métiazinique	Phényl butazone	Indométacine
Toxicité aiguë	Souris	I.V.	350 (296-413)	165 (155-175)	30 (18-48)
		I.P.	380 (361-399)	280 (264-297)	14 (11-17)
		S.C.	voisine de 500	voisine de 360	
		P.O.	800 (640-1000)	465 (426-507)	20 (12-34)
Toxicité aiguë	Rat	P.O.	voisine de 500	650 (450-930)	38 (29-50)

Toxicité à terme

- Un mois :

Aux doses journalières de 10, 30 et 90 mg/kg p.o. chez le Rat et le Chien, le produit a été bien toléré aux trois doses. Chez les deux espèces, mise à part, chez le chien traité à la plus forte dose, une tendance anémique nette qui a d'ailleurs disparu dans un délai de 15 jours après l'arrêt du traitement.

- Trois mois :

Chez le Rat et le Chien, le produit a été bien toléré aux doses journalières de 30 et 60 mg/kg p.o.

Administrée en deux prises journalières, la dose de 120 mg/kg p.o. est mal tolérée chez le Rat (mortalité de 25 %) et dans l'ensemble assez médiocrement tolérée chez le Chien (amaigrissement, anémie, lésions digestives, d'intensité et de fréquence très irrégulières).

Administré en deux prises journalières à la dose journalière de 180 mg/kg p.o. l'acide métiazinique entraîne la mort de 100 % des chiens dans un délai d'environ 1 mois.

L'action toxique, à cette très forte dose se manifeste au niveau des muqueuses digestives (hémorragies, ulcères), du sang (anémie et leucocytose, liées aux accidents digestifs), du foie (dysfonctionnement et lésions d'hépatite) et du rein (dysfonctionnement et cylindres hyalins dans les tubes).

- Action tératogène

Aux doses journalières de 10, 30 et 60 mg/kg p.o., administrées aux femelles gestantes (souris, rate et lapine) pendant la période sensible de la gestation, l'acide métiazinique est dépourvu d'action tératogène.

5 - METABOLISME

Les études relatives au comportement biologique de ce produit montrent qu'après administration par voie orale chez l'animal, on observe un passage rapide dans le sang et des taux sériques relativement élevés par rapport à ceux que l'on observe pour la même dose (100 mg/kg p.o.) avec les dérivés aminés de la phénothiazine doués de propriétés psychotropes.

Chez l'animal (Chien et Lapin) après administration d'une dose unique de 100 mg/kg p.o., l'excrétion urinaire en 72 heures représente de 10 à 25 % de la quantité de produit ingérée et l'excrétion fécale n'est pas négligeable dans le cas du chien (8 à 30 %).

L'excrétion urinaire chez l'Homme après ingestion d'une dose unique de 1 gramme semble plus importante, car pour 3 sujets 30 à 50 % du produit ont été retrouvés après 28 heures dans les urines, à l'état de métabolites principalement.

La biotransformation de l'acide métiazinique chez le Chien, chez le Lapin et chez l'Homme est sujette à des variations fréquentes suivant les individus mais d'une façon générale, il y a une certaine similitude entre la biotransformation observée chez le Lapin et celle observée chez l'Homme. Dans les deux cas, les dérivés hydroxylés à l'état libre et conjugué représentent avec l'acide métiazinique lui-même des métabolites importants.

Chez le Chien, au contraire, les variations semblent moins accusées et le dérivé S. oxyde de l'acide métiazinique constitue le métabolite majeur. (98)

6 - INDICATIONS THERAPEUTIQUES

Les principales indications sont les suivantes :

- poussées douloureuse d'arthroses
- arthrites et polyarthrites aiguës
- accès de goutte
- périarthrites et tendinites
- algies neurologiques (sciatique, névralgies cervico-brachiales et neuro-musculaires (lumbago, torticollis)
- troubles veineux (périphlébites, phlébites)
- polyarthrites rhumatoïdes.

7 - RESULTATS BIOLOGIQUES

Les examens biologiques portant sur l'hémogramme, l'azotémie la glycémie, les fonctions hépatiques et l'exploration de l'hémostase ont été normaux.

8 - TOLERANCE ET CONTRE-INDICATION

L'acide métiazinique n'apporte pas de perturbations aux grandes fonctions physiologiques.

Mais comme la plupart des anti-inflammatoires puissants, stéroïdiques ou non, l'acide métiazinique est doué d'une certaine toxicité, gastro-intestinale. Si l'on considère en particulier, la marge de sécurité qui existe entre les doses données d'activité anti-inflammatoire et les doses exerçant des effets secondaires sur le tractus gastro-intestinal, l'acide métiazinique apparaît supérieur à la phénylbutazone.

On a noté des cas de manifestations urinaires (brûlures à la miction, polyakiurie) ou d'éruptions cutanées, prurigineuses ou non. Chez des sujets ayant des antécédents digestifs divers, en particulier ulcéreux, l'acide métiazinique doit être utilisé avec précaution.

9 - CONCLUSION

L'acide métiazinique est un anti-inflammatoire non stéroïdique, doué en outre de propriétés analgésiques et antipyrétiques tout en étant peu toxique, et dépourvu d'autres propriétés pharmacologiques notables, en particulier du point de vue de l'action centrale. L'intérêt fondamental de l'acide métiazinique réside dans le fait qu'il allie à sa puissance et polyvalente efficacité, l'avantage d'une tolérance habituellement très satisfaisante aux doses usuelles. Ce qui lui confère une place de choix parmi les médicaments d'orientation thérapeutique analogue.

RECHERCHES
EXPERIMENTALES

CHAPITRE I

PROTOCOLE GENERAL D'EXPERIMENTATION

I - TRAITEMENT DES LAPINS

Les différents organes et le sang que nous avons utilisés pour notre expérimentation proviennent de lapins adultes albinos mâles, soumis à un régime alimentaire normal et sacrifiés par un coup sur la nuque : les organes sont alors prélevés immédiatement.

Les animaux traités par les anti-inflammatoires reçoivent per os des doses inférieures à la DL₀ soit :

- une première dose de :

- 40 mg/kg poids corporel - Indométacine
- ou 160 mg/kg poids corporel - Oxyphenbutazone
- ou 160 mg/kg poids corporel - Acide niflumique
- ou 300 mg/kg poids corporel - Acide métiазинique

- une deuxième dose identique, 24 heures après la première ingestion

Le sacrifice étant pratiqué 4 heures après la deuxième ingestion, le prélèvement des organes est alors effectué 28 heures après le début du traitement.

II - PREPARATIONS ENZYMATIQUES

I) Les organes

Après un lavage rapide à l'aide de solution physiologique isotonique, les organes sont séchés à l'aide de papier Joseph, pesés et additionnés en proportions convenables d'eau distillée préalablement maintenue au réfrigérateur à + 4° C. Un broyage de 2 à 3 minutes effectué à « L'Ultra-Turrax » permet d'obtenir un broyat parfaitement homogène. Les homogénats, ainsi obtenus, constituent les préparations enzymatiques, qu'ils seront dilués en proportions convenables selon la technique de dosage mise en jeu.

2) *Le sang*

Aussitôt le lapin assommé, le sang est prélevé par ponction cardiaque et recueilli sur héparine. Le sang est centrifugé 10 minutes à 4 500 t/mn. On sépare le plasma. Les hématies sont lavées avec du sérum physiologique et centrifugées de nouveau. Cette dernière opération est répétée 3 fois.

CHAPITRE II

DOSAGE DE LA LACTATE DESHYDROGENASE

La lactate deshydrogénase est connue depuis longtemps mais les techniques pratiques de dosage sont récentes (10, 102), nous avons utilisé la méthode de BERGER et BROIDA (14) reprise par CABAUD et WROBLEWSKI (23) avec quelques modifications de détails (10, 102).

I - PRINCIPE

La lactate déshydrogénase transforme en présence de NADH_2 , l'acide pyruvique en acide lactique et NAD. L'acide pyruvique restant réagit avec la 2 - 4 dinitro-phénylhydrazine, pour former une hydrazone dont la coloration est appréciée au photocolorimètre à 525 μ . Les autres composés sont incolores.

II - REACTIFS

- *Tampon phosphates à pH = 7,8 (Soerensen)*

Solution A = $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ M/15 à 9,078 g/l

Solution B = PO_4HNa_2 , 12 H_2O M/15 à 23,870 g/l

Mélanger 91,5 ml de B et 8,5 de A pour 100 ml de tampon. Vérifier le pH.

- *Solution de pyruvate de sodium à 110 mg/l soit 0,001 M.*

Faire la solution dans le tampon soit 11 mg de pyruvate dans 100 ml de tampon. Se conserve moins de 2 semaines.

- *Solution de diphospho pyridine-nucléotide réduit à 10 mg pour 1 ml d'eau distillée.*

Utiliser 0,1 ml de solution de DPNH dans chaque tube à incubé. Faire cette solution dans un bain de glace et l'utiliser immédiatement ne se conserve pas. Stocker le DPNH en chambre froide dans des flacons bien bouchés.

- Solution de soude 0,4 N (à 16 g/l)
- Solution de 2 - 4 dinitro-Phényl-Hydrazine

2 - 4 DNPH	200 mg
HCl concentré	85 ml
Eau distillée q.s.q	1 l de réactif

Conserver à 4° C à l'obscurité.

III - MODE OPERATOIRE

Faire incuber une série de tubes pendant 30 minutes et une autre série pendant 60 minutes dans un bain marie équipé d'un thermostat Thermomix réglé à 37° C.

- *Chaque essai* (activité enzymatique) : 1 ml de solution de pyruvate de sodium ; 0,1 ml de préparation enzymatique et 0,1 ml de solution de NADH₂.

- *Témoin* (activité spontanée) : 1 ml de solution de pyruvate de sodium ; 0,1 ml d'eau distillée et 0,1 ml de solution de NADH₂.

Au terme de l'incubation, ajouter dans tous les tubes 1 ml de 2 - 4 DNPH pour stopper la réaction. Agiter. Laisser reposer 20 minutes à la température du laboratoire (20° C environ). Ajouter 10 ml de NaOH 0,4 N. Agiter. Après 10 à 15 minutes environ, apprécier la coloration obtenue au photocolorimètre à 525 mμ après avoir préparé les témoins de réglage.

L'étalonnage est effectué à l'aide de la solution de pyruvate de sodium dont les volumes de 0 - 0,1 0,9, 1 ml additionnés de 1,2 - 1,1 0,3 - 0,2 ml d'eau distillée et traités comme indiqué ci-dessus, correspondant respectivement à 100 - 90 10 - 0 pour cent d'activité.

IV - EXPRESSION DES RESULTATS

Pour chaque activité enzymatique examinée, après avoir exposé le principe de la technique d'étude, les précisions pour la préparation des réactifs utilisés, les détails du protocole opératoire, nous présentons un tableau condensé des résultats expérimentaux où sont indiqués :

- la nature et le taux de dilution de la préparation enzymatique
- le nombre d'organes utilisés.
- le temps d'incubation au bain-marie
- la moyenne arithmétique M des résultats exprimés en pourcentage de substrat métabolisé dans les conditions d'expérimentation.
- le calcul de la « limite de la distribution de student à 95 % établi selon la formule :

$$a = t \sqrt{\frac{\Sigma (M - M_0)^2}{n(n-1)}}$$

dans laquelle :

Σ = somme

M = moyenne arithmétique des résultats

M_0 = résultat partiel

n = nombre d'expériences.

Les différentes valeurs de t, en fonction de n, sont données par la table de « student à 95 % ».

CHAPITRE III

SEPARATION DES ISOENZYMES DE LA LDH

Microzone Beckman

I - PRINCIPE

Après migration différentielle par électrophorèse sur membrane d'acétate de cellulose, les isoenzymes de la LDH sont révélés selon la technique de FISHER et coll. (40) en utilisant un gel d'agar-agar dans lequel est incorporé le substrat (lactate de sodium) :



Le NADH_2 par l'intermédiaire du méthosulfate de phénazine qui joue le rôle de transporteur d'électrons, réagit avec le nitro-bleu tétrazolium donnant un diformazan dont la coloration est appréciée à 680 m μ .

II - REACTIFS

1 - Tampons

A - Tris HCl 0,2 M pH 8,3

Dissoudre 24,2 g de tris 7-9 (tris - (Hydroxyméthyl) - aminométhane) dans 700 ml d'eau distillée. Ajouter HCl concentré jusqu'à pH 8,3 puis eau distillée q.s.p. 1 000 ml.

B - Tampon au barbital, force ionique 0,075 pH 8,6 (Tampon B-2 Beckman)

Barbital	2,76 g
Barbital sodique	15,40 g
Eau q.s.p.	1 l

C - Tampon tris HCl Barbitol pH 8,4

Mélanger à volume égal les deux premières solutions de tampon. Conserver au réfrigérateur et s'en servir immédiatement à la sortie du réfrigérateur.

2 - Réactifs

- Le gel correspondant à la composition suivante dont 100 ml suffisent pour remplir 5 bacs.

- a) 1,5 g de DIFCO spécial Noble Agar
- b) 70 ml de tampon tris HCl (et non pas de tris HCl Barbitol)
- c) 2 ml de lactate de sodium (en solution à 60 %)
- d) 20 ml de tétrazolium nitro bleu (1 mg/ml dans eau distillée) (Formule : 2 - 2' di-p-nitrophenyl-5, 5' diphényl - [3,3' - diméthoxy 4-4'-diphénylène

Cette solution est stable pendant au moins une semaine si elle est gardée au réfrigérateur.

- e) 2 ml de méthosulfate phénazine (1 mg/ml dans de l'eau distillée)

Préparer journellement et garder au réfrigérateur.

- f) 100 mg d'adénine-nicotinamide-dinucléotide (NAD) dissous au moment de l'emploi dans 6 ml d'eau distillée. Le NAD est conservé dans un récipient sec au réfrigérateur et sa stabilité est environ de 6 mois.

- Préparer quotidiennement le gel, pour cela,
- Dissoudre l'agar dans du tampon tris-HCl en chauffant. Noter qu'il s'agit du tampon tris-HCl et non du mélange tris - HCl au barbitol utilisé pour l'électrophorèse.
- En tournant, ajouter dans l'ordre :
 - la solution de lactate de sodium
 - le tétrazolium nitrobleu
 - le méthosulfate phénazine
 - le NAD
- Verser le mélange dans un bac sur une épaisseur d'environ 3 mm
- Placer le bac avec le gel à l'obscurité à la température ambiante (Le méthosulfate phénazine est extrêmement sensible à la lumière).
- Placer un couvercle légèrement soulevé sur le bac. Le processus de gélification doit se faire en atmosphère humide, mais ne doit pas permettre à l'humidité de se former en grande quantité au-dessus du gel, car des gouttes d'eau pourraient tomber sur la surface de celui-ci et former des moisissures irrégulières.
- Observer l'humidité sous le couvercle et quand elle est évaporée, fermer le couvercle complètement.

3 - Solution de rinçage

200 ml au moins d'acide acétique à 10 %.

Préparation des échantillons

1 - Le sang

Le sang est prélevé par ponction cardiaque :

— une partie du sang est recueillie sans anticoagulant dans un tube à hémolyse. On le centrifuge. Le sérum recueilli doit être clair et non hémolysé. Le sérum doit être conservé à la température ambiante.

— une autre partie du sang est recueillie sur anticoagulant (Héparine). On le centrifuge, on enlève le plasma et les globules blancs. On lave trois fois les hématies au sérum physiologique. Chaque lavage s'accompagne d'une centrifugation. On enlève le sérum physiologique surnageant. On recueille les hématies.

2 - Les organes

Le cerveau, le coeur, le foie, le muscle jambier, les reins et les glandes surrénales sont prélevés, lavés, pesés. On fait des homogénats convenablement dilués.

Dilutions employées et nombre d'applications :

Organes	Dilutions	Nombre d'applications
Muscle	1/100	1
Cerveau	1/40	1
Foie	1/100	1
Reins	1/80	1
Hématies	1/20	1
Sérum	1/2	4
Coeur	1/150	1
Glandes surrénales	1/20	1

III - TECHNIQUE :

1) Remplir la cuve microzone avec le tampon au barbital tris - HCl réfrigéré. Humidifier la membrane avec le même tampon, enlever l'excès de tampon à l'aide de buvards, la placer sur le pont et attendre deux minutes pour permettre à la membrane et à la cuve de s'équilibrer.

2) Avec le cavalier de l'applicateur d'échantillons, dans la rainure de position centrale, faire une ou plusieurs applications suivant l'échantillon.

L'électrophorèse dure 40 minutes à 150 volts avec le sélecteur mis à 0-300 « Constant - Voltage ». Tester le courant. Il ne doit pas excéder 8 mA en fin d'opération.

Après la migration, couper environ 3 cm de membrane à chaque extrémité pendant que la membrane est encore sur le pont. Retirer rapidement la membrane du pont et la mettre de face, sur le gel réactif, en évitant les bulles d'air. Mettre le gel et la membrane dans un incubateur à 37° C pendant 30 minutes pour une pleine coloration.

Après l'incubation, rincer rapidement la membrane à l'eau, pendant quelques secondes, gratter très légèrement avec les doigts pour retirer le fin dépôt de gel adhérent à la membrane.

Placer la membrane dans l'acide acétique à 10 %, 2 minutes en agitant. Le support doit devenir complètement blanc. Essorer et placer la membrane entre 2 buvards. Sécher le tout à l'étuve (50° C au moins) pendant plusieurs heures. Stocker les membranes à l'obscurité car les zones tendent à pâlir.

Mesure quantitative :

Lire à l'aide du densitomètre Microzone R 110 aussitôt que possible à 680 m μ .

RESULTATS

EXPERIMENTAUX

CHAPITRE I

ETUDE DE LA LACTATE DESHYDROGENASE DU CERVEAU DE LAPIN

I - GENERALITES

Chez le Rat, l'étude des diverses formations neuroniques du système nerveux central (132) a montré des activités différentes de la lactate deshydrogénase. C'est ainsi que les noyaux moteurs des nerfs crâniens présentent une activité élevée tandis que les formations sympathiques centrales ont une activité plus faible aussi bien au point de vue neuropile qu'à celui du neuroplasma.

L'Olive bulbaire, les noyaux amygdaliens possèdent une forte activité, le noyau rouge et le gris central entourant l'aqueduc de Sylvius une activité plus faible, le thalamus, une activité encore plus faible.

La microglie pose un problème distinct. Au repos, cette cellule ne présente pas d'activité décelable de la lactate deshydrogénase intervenant dans la dégradation du glucose. Mais il suffit qu'elle soit mobilisée en vue d'exercer une activité de phagocytose (132) pour que le métabolisme s'intensifie et que la lactate deshydrogénase et en particulier l'Iso F (L.D.H.₁ et L.D.H.₂) acquiert une activité bien marquée.

Chez le Lapin, PLAGEMANN, GREGORY et WROBLEWSKI (96) établirent la répartition des isoenzymes de la lactate deshydrogénase du cerveau. Ils obtinrent les résultats suivants : L.D.H.₁ = 43 p. 100, L.D.H.₂ = 20 p. 100 L.D.H.₃ = 27 p. 100, L.D.H.₄ = 6 p. 100 et L.D.H.₅ = 4 p. 100.

Il n'a été relevé dans la littérature aucune référence relative à l'action des anti-inflammatoires non stéroïdiques sur la lactate deshydrogénase et de ses isoenzymes sur le cerveau de Lapin.

TABLEAU I — Activité lactate déshydrogénasique.

Pourcentages d'acide pyruvique métabolisé avec les homogénats de cerveaux de lapins, sacrifiés 28 heures après ingestion d'anti-inflammatoires non stéroïdiques.

Préparations enzymatiques		Nombre de cerveaux utilisés	Temps d'incubation (minutes)			
			30		60	
			M	a	M	a
Homogénats dilués au 1/500	Témoin	7	25,7	2,5	35,0	1,7
	Indométacine	7	23,5	2,2	34,2	2,6
	Oxyphenbutazone	7	22,4	1,5	32,6	2,8
	Ac.niflumique	7	22,6	3,1	33,2	3,4
	Ac. métiazinique	7	27,0	2,1	41,2	3,7
Homogénats dilués au 1/500	Témoin	7	12,0	0,9	15,0	1,8
	Indométacine	7	11,4	3,5	14,2	2,6
	Oxyphenbutazone	7	10,3	1,0	12,4	1,6
	Ac.niflumique	7	10,5	0,5	12,6	1,9
	Ac. métiazinique	7	12,7	2,1	16,0	1,2

Témoin

Poids moyen des lapins 3,500 kg < P < 4,700 kg
 Poids moyen des cerveaux 4,521 g < Pc < 6,021 g

Indométacine

Poids moyen des lapins 4,500 kg < P < 5,000 kg
 Poids moyen des cerveaux 5,128 g < Pc < 6,850 g

Oxyphenbutazone

Poids moyen des lapins 4,100 kg < P < 4,900 kg
 Poids moyen des cerveaux 5,200 g < Pc < 6,120 g

Acide niflumique

Poids moyen des lapins 4,100 kg < P < 5,600 kg
 Poids moyen des cerveaux 5,163 g < Pc < 7,750 g

Acide métiazinique

Poids moyen des lapins 4,000 kg < P < 4,900 kg
 Poids moyen des cerveaux 4,730 g < Pc < 6,098 g

ACTION D'ANTI-INFLAMMATOIRES NON STEROIDIQUES SUR
L'ACTIVITE LACTATE DESHYDROGENASIQUE DU CERVEAU DE LAPIN

(Incubation : 60 minutes, homogénats au 1/500)

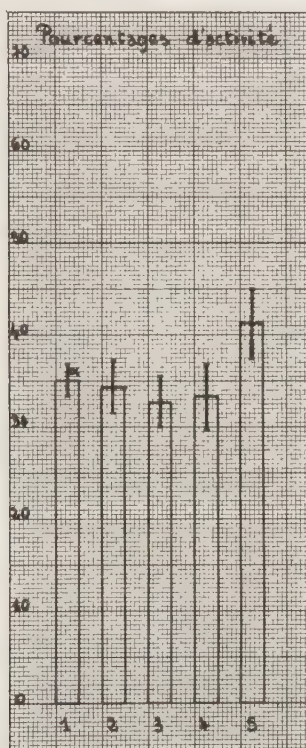
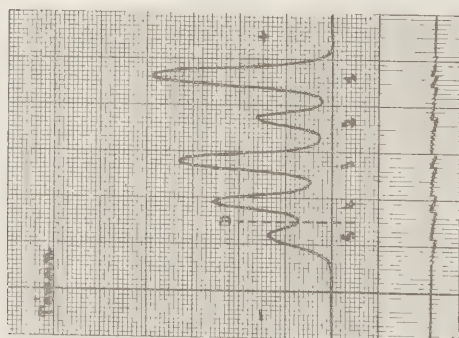
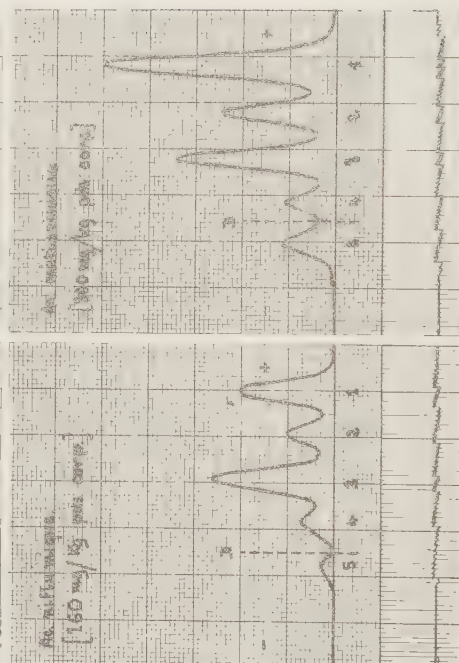
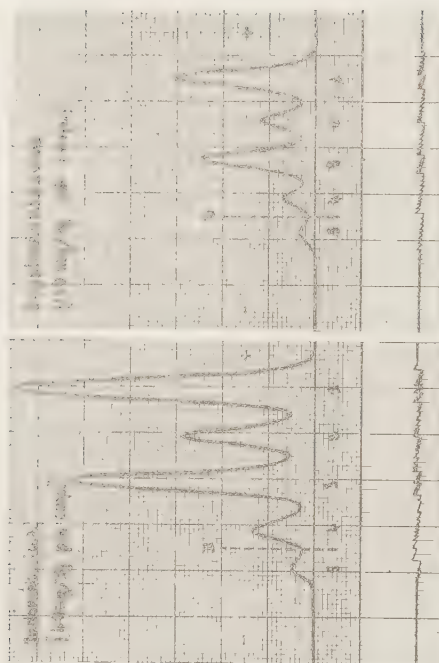


Figure I

- | | |
|-----------------------|----------------------------|
| 1. Témoin | |
| 2. Indométacine | (40 mg/kg poids corporel) |
| 3. Oxyphenbutazone | (160 mg/kg poids corporel) |
| 4. Acide niflumique | (160 mg/kg poids corporel) |
| 5. Acide métiázinique | (300 mg/kg poids corporel) |



ACTION D'ANTI-INFLAMMATOIRES NON STEROIDIQUES
SUR LES ISOENZYMES DE LA LACTATE DESHYDROGENASE
DU CERVEAU DE LAPIN
(Homogénats au 1/40)



TABEAU II - Action des anti-inflammatoires non stéroïdiques, sur la répartition exprimée en pourcentages (+) des isoenzymes de la lactate déshydrogénase du cerveau de Lapin.

Isoenzymes	LDH 1	LDH 2	LDH 3	LDH 4	LDH 5
Témoin	27,5	13,8	24,1	19,5	14,9
Indométacine	41,4	17,0	29,2	9,8	2,4
Oxyphenbutazone	33,8	15,4	27,7	12,3	10,8
Acide niflumique	27,3	16,7	31,8	15,1	9,1
Acide métiazinique	35,9	17,6	22,3	11,6	12,6

II - RESULTATS

1 - Etude globale

L'examen des résultats concernant l'activité lactate deshydrogénasique décelée par voie biochimique au niveau du cerveau de Lapin témoin, révèle une activité assez intense : 25,7 p. 100 pour une incubation de 30 minutes et une dilution au 1/500 (Tableau I).

Les essais effectués par voie biochimique, chez les animaux traités permettent de noter une légère diminution de 2,2 p. 100 à 6,8 p. 100 pour les anti-inflammatoires suivants : indométacine, oxyphenbutazone et acide niflumique et une petite augmentation de 17,7 p. 100 pour l'acide métiazinique. L'oxyphenbutazone d'une part et l'acide métiazinique d'autre part, se révèlent les effecteurs les plus actifs (Tableau I, figure I). D'une façon générale, nous n'observons pas de grosses variations.

2 - Etude différentielle

Chez le Lapin témoin, les essais que nous avons effectués, donnent les pourcentages suivants : LDH₁ = 27,5 p. 100, LDH₂ = 13,8 p. 100, LDH₃ = 24,1 p. 100, LDH₄ = 19,5 p. 100 et LDH₅ = 14,9 p. 100 (Tableau II)

(+) Les pourcentages sont calculés à l'aide de l'intégrateur de surface.

Chez les lapins traités, l'étude de la répartition des isoenzymes de la lactate deshydrogénase du cerveau de Lapin révèle.

- *Pour l'indométacine :*

- une augmentation de 50,5 p. 100 pour la LDH₁, 23,1 p. 100 pour la LDH₂ et 21,1 p. 100 pour la LDH₃.

- une diminution de 49,7 p. 100 pour la LDH₄ et 83,8 p. 100 pour la LDH₅.

- *pour l'oxyphenbutazone :*

- une augmentation de 22,9 p. 100 pour la LDH₁, 11,5 p. 100 pour la LDH₂ et 14,9 p. 100 pour la LDH₃.

- une diminution de 36,9 p. 100 pour la LDH₄ et de 27,5 p. 100 pour la LDH₅.

- *pour l'acide niflumique*

- une très faible modification de la LDH₁

- une augmentation de 21,0 p. 100 pour la LDH₂ et de 31,9 p. 100 pour la LDH₃.

- une diminution de 22,5 p. 100 pour la LDH₄ et de 38,9 p. 100 pour la LDH₅.

- *pour l'acide métiazinique :*

- une augmentation de 30,5 p. 100 de la LDH₁, 27,5 p. 100 de la LDH₂.

- une diminution légère de la LDH₃ : 7,4 p.100, de 40,5 p. 100 pour la LDH₄ et de 15,4 p. 100 pour la LDH₅.

En conclusion, le traitement par les anti-inflammatoires non stéroïdiques provoque une augmentation importante des isoenzymes suivants : LDH₁, LDH₂ et LDH₃ (glycolyse aérobie) et une diminution des isoenzymes LDH₄ et LDH₅ (glycolyse anaérobie). L'indométacine se révèle l'effecteur le plus actif.

CHAPITRE II

ETUDE DE LA LACTATE DESHYDROGENASE DU COEUR DE LAPIN

I - GENERALITES

La plupart des recherches sur la lactate deshydrogénase et ses isoenzymes furent faites sur le muscle cardiaque.

STRAUB en 1940 (119) décrit des préparations d'enzymes cristallines à partir du coeur de boeuf, WIELAND et coll. (133, 134) et NISSELBAUM et coll. (83) firent de même pour les coeurs de Rat et de l'Homme.

STRAUB (119) montra le procédé d'isolement de l'enzyme du coeur de boeuf, ce procédé a pu être utilisé pour le coeur de porc (75) et fut aussi utilisé pour les premiers stades de la purification de l'enzyme du muscle cardiaque de l'Homme (83)

NEILANDS en 1952 (82) fut le premier à montrer que la lactate deshydrogénase du coeur de boeuf pouvait être séparée avec l'appareil de Tiselius, en deux composants protéiniques, chacun de ces composés possédant une activité enzymatique

L'isoenzyme prédominant du muscle cardiaque est la L.D.H.₁. Elle est d'ailleurs appelée fraction cardiaque ou fraction H (Heart). Pendant l'électrophorèse, la L.D.H.₁ portant la charge électrique négative la plus forte, se déplace vers l'anode

La L.D.H.₁ du muscle cardiaque permet au coeur d'extraire du lactate du sang artériel et de le cataboliser en passant par le pyruvate dans le cycle de Krebs (50).

PESCE et coll. (89, 90, 91) et FONDY et coll. (41, 42) ont étudié la composition en acides aminés de la L.D.H.₁.

WIEME en 1959 (135) a montré qu'une élévation anormale de la L.D.H. dans le sérum, provenait d'une atteinte du tissu cardiaque due à un infarctus du myocarde.

WIEME (137) établit chez l'Homme, la répartition des isoenzymes de la lactate deshydrogénase du muscle cardiaque, de la façon suivante :

$$\text{L.D.H.}_1 = 35,0 \text{ p } 100 \quad - \quad \text{L.D.H.}_2 = 25,6 \text{ p } 100 \quad - \quad \text{L.D.H.}_3 = 11,8 \text{ p. } 100$$

$$\text{L.D.H.}_4 = 16,4 \text{ p } 100 \quad - \quad \text{et} \quad \text{L.D.H.}_5 = 10,8 \text{ p } 100$$

Chez le Lapin, PLAGEMAN et coll. (96) ont trouvé 100 p. 100 de L.D.H.₁ alors que WIELAND et coll. (134) décelèrent la présence des cinq isoenzymes. La L.D.H.₁ toujours prédominante, à un pourcentage de 94 p. 100 alors que les L.D.H.₂, L.D.H.₃, L.D.H.₄ et L.D.H.₅ ont respectivement les pourcentages de 2 p. 100, 1 p. 100, 3 p. 100 et inférieur à 1 p. 100.

Les recherches bibliographiques ne nous ont pas permis de relever des travaux relatifs à l'action des anti-inflammatoires non stéroïdiens sur la lactate deshydrogénase cardiaque.

II - RECHERCHES EXPERIMENTALES

TABLEAU III - Activité lactate deshydrogénase

Pourcentages d'acide pyruvique métabolisé avec les homogénats de coeurs de lapins, sacrifiés 28 heures après ingestion d'anti-inflammatoires non stéroïdiques.

Preparations enzymatiques		Nombre de coeurs	Temps d'incubation (minutes)			
			30		60	
			M	a	M	a
Homogénats dilués au 1/2000	Témoin	7	44,3	3,6	63,0	5,7
	Indométacine	7	41,1	3,1	61,3	7,3
	Oxyphenbutazone	7	45,1	4,2	66,2	6,5
	Ac. niflumique	7	45,9	5,3	71,5	8,2
	Ac. métiazinique	7	40,5	3,8	61,0	4,9
Homogénats dilués au 1/3000	Témoin	7	27,4	2,1	41,7	3,6
	Indométacine	7	27,0	2,6	39,4	4,7
	Oxyphenbutazone	7	32,0	3,7	44,8	5,2
	Ac. niflumique	7	33,4	4,0	49,1	6,3
	Ac. métiazinique	7	25,7	2,1	39,2	3,8

<i>Témoin</i>	Poids moyen des lapins	3,500 kg	< P	< 4,700 kg
	Poids moyen des coeurs	5,705 g	< Pc	< 8,280 g
<i>Indométacine</i>	Poids moyen des lapins	4,500 kg	< P	< 5,000 kg
	Poids moyen des coeurs	4,908 g	< Pc	< 7,629 g
<i>Oxyphenbutazone</i>	Poids moyen des lapins	4,100 g	< P	< 4,900 kg
	Poids moyen des coeurs	4,611 g	< Pc	< 7,320 g
<i>Acide niflumique</i>	Poids moyen des lapins	4,100 kg	< P	< 5,600 kg
	Poids moyen des coeurs	5,113 kg	< Pc	< 7,045 g
<i>Acide métiazinique</i>	Poids moyen des lapins	4,000 kg	< P	< 4,900 kg
	Poids moyen des coeurs	4,889 g	< Pc	< 7,831 g

ACTION D'ANTI-INFLAMMATOIRES NON STEROÏDIQUES SUR
L'ACTIVITE LACTATE DESHYDROGENASIQUE DU COEUR DE LAPIN

(Incubation : 30 minutes, homogénats au 1/3000)

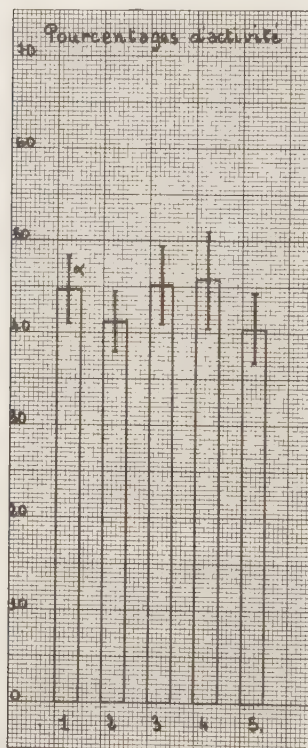
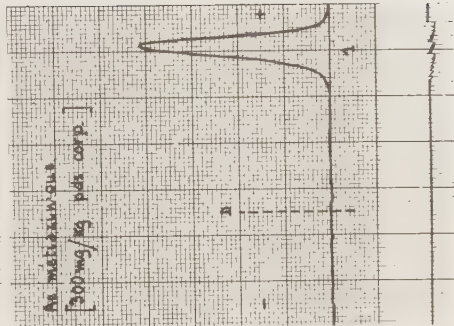
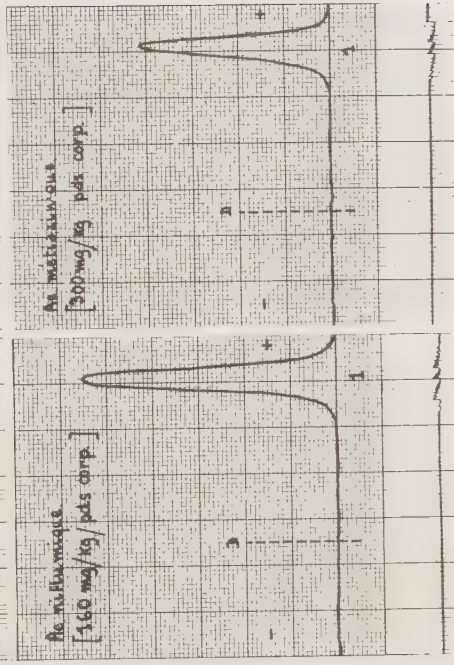
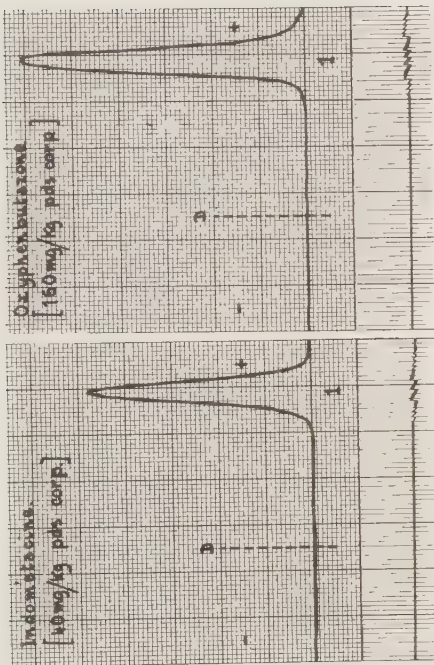
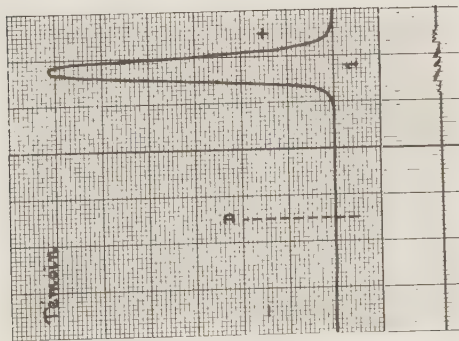


Figure 2

- | | | |
|-----------------------|------------|-----------------|
| 1. Témoin | | |
| 2. Indométacine | (40 mg/kg | poids corporel) |
| 3. Oxyphenbutazone | (160 mg/kg | poids corporel) |
| 4. Acide niflumique | (160 mg/kg | poids corporel) |
| 5. Acide métiazinique | (300 mg/kg | poids corporel) |



ACTION D'ANTI-INFLAMMATOIRES NON STEROÏDIQUES
SUR LES ISOENZYMES DE LA LACTATE DESHYDROGENASE
DU COEUR DE LAPIN
(Homogénats au 1/150)

TABLEAU IV - Action des anti-inflammatoires non stéroïdiens sur la répartition, exprimée en pourcentages (*) des isoenzymes de la lactate deshydrogénase du coeur de Lapin.

Isoenzymes	LDH 1	LDH 2	LDH 3	LDH 4	LDH 5
Témoin	100	0	0	0	0
Indométacine	100	0	0	0	0
Oxyphenbutazone	100	0	0	0	0
Acide niflumique	100	0	0	0	0
Acide métiazinique	100	0	0	0	0

(*) La LDH₁ étant unique, les variations ne sont pas calculées à partir des pourcentages mais à l'aide des valeurs données par l'intégrateur de surface du densitomètre Microzone Beckman

III - RESULTATS

1 - Etude globale

L'activité lactate deshydrogénasique décelée par voie biochimique au niveau du coeur chez le Lapin témoin est très intense. Elle est de 44,3 p. 100 pour une incubation de 30 minutes et un homogenat au 1/2000 (Tableau III).

L'examen des résultats des dosages biochimiques effectués chez les animaux traités ne nous permet pas d'observer de grosses variations. Chez les animaux traités à l'oxyphenbutazone et l'acide niflumique, nous constatons une légère augmentation de 1,8 p. 100 à 3,6 p. 100 alors que l'indométacine et l'acide métiazinique provoquent une légère baisse de 7,2 p. 100 à 8,5 p. 100 (Tableau III, figure 2).

2 - Etude différentielle

Après migration électrophorétique sur membrane de cellulose, révélation et lecture au densitomètre Microzone Beckman, nous constatons la présence d'un seul isoenzyme, ayant migré vers l'anode ; il se compose essentiellement de LDH₁.

Chez le coeur du Lapin témoin, comme chez le coeur des lapins traités aux anti-inflammatoires non stéroïques essayés (Indométacine, oxyphenbutazone, acide niflumique et acide métiazinique) nous notons la présence d'une seule isoenzyme, la L.D.H.₁ et les quatre autres sont absentes. Le pourcentage de la L.D.H.₁ est donc de 100 p. 100 (Tableau IV).

Les variations constatées ont été calculées directement à partir des résultats donnés par l'intégrateur de surface. L'indométacine et l'acide niflumique provoquent respectivement une légère baisse de 2,8 p. 100 et de 11,4 p. 100, alors que l'acide métiazinique cause une diminution plus sensible de 22,8 p. 100. Après traitement à l'oxyphenbutazone, nous enregistrons une augmentation de 37,1 p. 100 de la L.D.H.₁.

En conclusion, nous voyons que les anti-inflammatoires non stéroïdiques étudiés ne causent pas d'importantes modifications à l'activité lactate deshydrogénasique du coeur de Lapin. L'oxyphenbutazone semble être l'effecteur le plus actif sur l' isoenzyme L.D.H.₁ du coeur de Lapin.

CHAPITRE III

ETUDE DE LA LACTATE DESHYDROGENASE

DU FOIE DE LAPIN

I - GENERALITES

Le diagnostic des affections hépatiques est très complexe. Différents tests enzymatiques sont capables de préciser l'importance des lésions hépatiques. Les cellules altérées laissent s'écouler dans le plasma sanguin de nombreux enzymes. .

WIEME et VAN MAERCKE (140) montrèrent qu'il y avait une augmentation de l'isoenzyme 5 de la lactate deshydrogénase, à la suite d'une nécrose du tissu hépatique causée par un traitement au tétrachlorure de carbone que l'on intubait à des rats. La hausse de l'enzyme pouvait être observée en moins de vingt quatre heures. Le taux de L.D.H.5 diminuait cependant si l'on prolongeait le traitement au tétrachlorure de carbone. Ces auteurs ont pensé que le maintien du traitement abaissait les processus du métabolisme normal des cellules hépatiques.

PLATT et COCKRILL (97) ont étudié les modifications causées par l'administration d'anti-inflammatoires non stéroïdiques (Indométacine , phénylbutazone) sur plusieurs enzymes du foie de Rat, dont la lactate deshydrogénase. Ces auteurs ont remarqué que ni l'indométacine, ni la phénylbutazone ne produisaient d'effet notable sur le poids relatif du foie. Ils ont noté toutefois que ces corps provoquaient une augmentation sensible de la concentration des protéines microsomales. L'indométacine n'a pas modifié l'activité lactate deshydrogénasique du foie alors qu'il n'en a pas été de même pour la phénylbutazone.

Chez le Lapin, selon les auteurs, la répartition des isoenzymes de la lactate deshydrogénase n'est pas la même.

PLAGEMAN et coll. (96) donnent les pourcentages suivants :

L.D.H.₁ = 2 p. 100, L.D.H.₂ = 4 p. 100, L.D.H.₃ = 24 p. 100, L.D.H.₄ = 59 p. 100 et L.D.H.₅ = 11 p. 100 tandis que WIELAND et coll. (134) trouvent pour la L.D.H.₁ = 1 p. 100, la L.D.H.₂ = 3 p. 100, la L.D.H.₃ = 17 p. 100, la L.D.H.₄ = 39 p. 100 et la L.D.H.₅ = 40 p. 100.

Chez l'Homme, WIEME (135, 136) a établi les pourcentages des différentes fractions de la lactate deshydrogénase de la façon suivante :

L.D.H.₁ = 2,0 p. 100, L.D.H.₂ = 4,3 p. 100, L.D.H.₃ = 11,0 p. 100, L.D.H.₄ = 27,0 p. 100 et L.D.H.₅ = 55,1 p. 100.

II - RECHERCHES EXPERIMENTALES

TABLEAU V - Activité lactate déshydrogénasique.

Pourcentages d'acide pyruvique métabolisé avec les homogénats du foie de lapins, sacrifiés 28 heures après ingestion d'anti-inflammatoires non stéroïdiques.

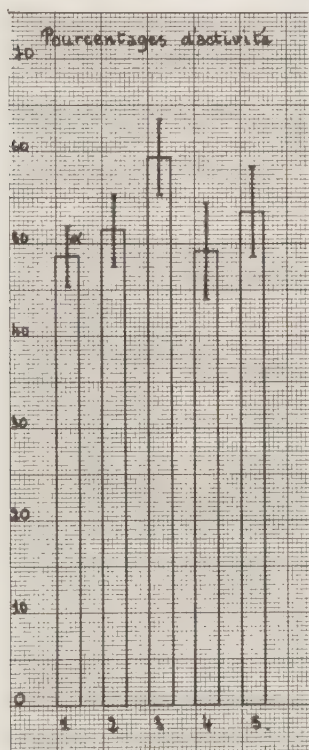
Préparations enzymatiques		Nombre de foies utilisés	Temps d'incubation (minutes)			
			30		60	
			M	a	M	a
Homogénats dilués au 1/500	Témoin	7	30,8	2,1	48,6	3,3
	Indométacine	7	32,5	1,9	51,5	3,8
	Oxyphenbutazone	7	40,5	2,4	59,2	4,0
	Ac.niflumique	7	31,1	2,2	49,1	5,1
	Ac.métiazinique	7	33,1	1,6	53,5	4,9
Homogénats dilués au 1/1000	Témoin	7	29,2	2,0	40,4	3,1
	Indométacine	7	30,6	1,7	42,8	4,0
	Oxyphenbutazone	7	32,8	6,0	45,3	5,4
	Ac. niflumique	7	30,0	2,6	40,7	3,7
	Ac. métiazinique	7	31,3	3,1	43,5	4,2

<i>Témoin</i>	Poids moyen des lapins	3,500 kg	< P < 4,700 kg
	Poids moyen des foies (*)	3,102 g	< Pf < 4,328 g
<i>Indométacine</i>	Poids moyen des lapins	4,500 kg	< P < 5,000 kg
	Poids moyen des foies	2,325 g	< Pf < 3,576 g
<i>Oxyphenbutazone</i>	Poids moyen des lapins	4,100 kg	< P < 4,900 kg
	Poids moyen des foies	2,840 g	< Pf < 4,113 g
<i>Acide niflumique</i>	Poids moyen des lapins	4,100 kg	< P < 5,600 kg
	Poids moyen des foies	2,816 g	< Pf < 4,427 g
<i>Acide métiazinique</i>	Poids moyen des lapins	4,000 kg	< P < 4,900 kg
	Poids moyen des foies	2,381 g	< Pf < 4,506 g

(*) Nous n'avons pu employer le foie entier, du fait de son important volume. Nous avons toujours utilisé l'extrémité du lobe droit.

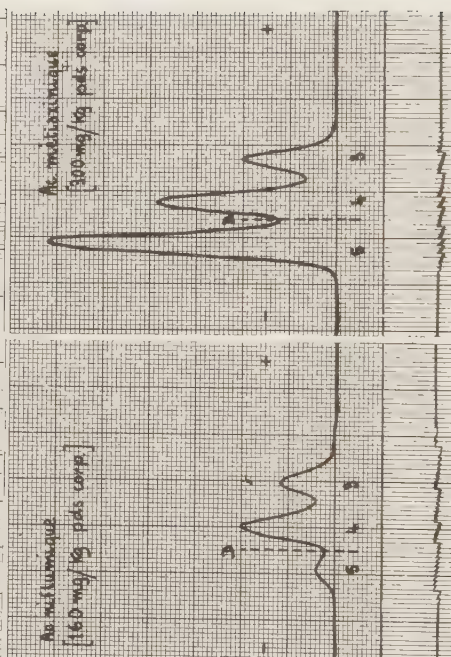
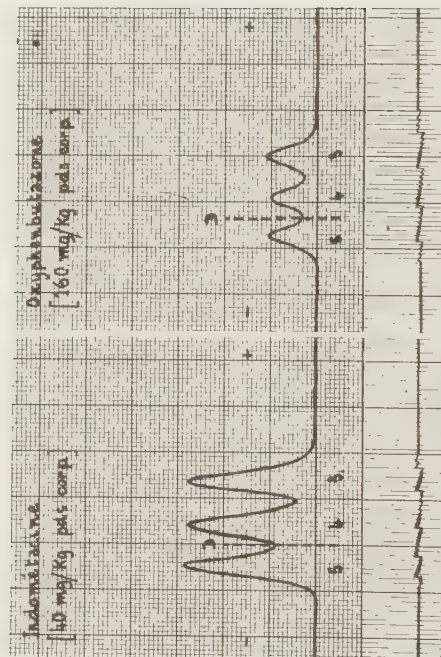
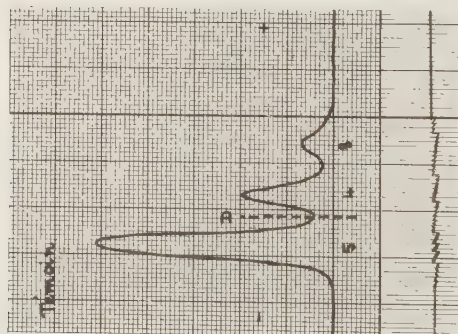
ACTION D'ANTI-INFLAMMATOIRES NON STEROIDIQUES SUR
L'ACTIVITE LACTATE DESHYDROGENASIQUE DU FOIE DE LAPIN

(Incubation : 60 minutes, homogénats au 1/500)



- Figure 3

- | | |
|------------------------|----------------------------|
| 1. Témoin | |
| 2. Indométacine | (40 mg/kg poids corporel) |
| 3. Oxyphenbutazone | (160 mg/kg poids corporel) |
| 4. Acide niflumique | (160 mg/kg poids corporel) |
| 5. Acide métiiazinique | (300 mg/kg poids corporel) |



TION D'ANTI-INFLAMMATOIRES NON STEROIDIQUES
LES ISOENZYMES DE LA LACTATE DESHYDROGENASE
DU FOIE DE LAPIN
(Homogénats au 1/100)

TABLEAU VI - Action des anti-inflammatoires non stéroïdiques sur la répartition exprimée en pourcentages, des isoenzymes de la lactate deshydrogénase du foie de Lapin.

Isoenzymes	LDH 1	LDH 2	LDH 3	LDH 4	DLH 5
Témoin	0	0	16,4	26,8	56,7
Indométacine	0	0	32,5	34,8	32,5
Oxyphenbutazone	0	0	38,8	27,7	33,3
Acide niflumique	0	0	34,1	43,9	21,9
Acide métiazinique	0	0	21,6	30,1	48,1

III - RESULTATS.

1 - Etude globale.

Les dosages biochimiques effectués sur la lactate deshydrogénase du foie de Lapin témoin ont montré que l'activité de l'enzyme était assez importante. Elle est de 30,8 p. 100 pour une incubation de 30 minutes et un homogénat au 1/500 (Tableau V).

L'activité lactate deshydrogénasique décelée par voie biochimique au niveau du foie des lapins traités subit une augmentation générale de 1,0 p. 100 à 21,8 p. 100. L'oxyphenbutazone est l'effecteur le plus actif (Tableau V, figure 3).

2 - Etude différentielle

Chez les lapins témoins, les différents isoenzymes de la lactate deshydrogénase du foie se répartissent de la façon suivante:

L.D.H.₁ = 0 p. 100, L.D.H.₂ = 0 p. 100, L.D.H.₃ = 16,4 p. 100, L.D.H.₄ = 26,8 p. 100 et la L.D.H.₅ = 56,7 p. 100 (Tableau VI).

Chez les lapins traités aux anti-inflammatoires non stéroïdiques, l'examen de la répartition des isoenzymes de la lactate deshydrogénase du foie nous permet de constater :

pour *l'indométacine*

– une augmentation de 98,1 p. 100 de la L.D.H.3 et de 29,8 p. 100 de la L.D.H.4.

– une diminution de 42,6 p. 100 de la L.D.H.5

pour *l'oxyphenbutazone*

– une augmentation de 136,5 p. 100 de la L.D.H.3 et une de 3,3 p. 100 de la L.D.H.4.

– une diminution de 41,2 p. 100 de la L.D.H.5

pour *l'acide niflumique*

– une augmentation de 107,9 p. 100 de la L.D.H.3 et de 63,8 p. 100 de la L.D.H.4.

– une diminution de 61,3 p. 100 de la L.D.H.5.

pour *l'acide métiazinique* :

– une augmentation de 31,7 p. 100 de la L.D.H.3 et de 12,0 p. 100 de la L.D.H.4

– une diminution de 15,1 p. 100 de la L.D.H.5.

En conclusion, la modification la plus sensible observée sur la lactate deshydrogénase du foie de Lapin est due à l'oxyphenbutazone alors que les trois autres produits n'apportent que de faibles variations.

Des changements plus importants sont constatés sur la répartition des isoenzymes de la lactate deshydrogénase du foie des lapins traités. Les trois produits suivants : indométacine, oxyphenbutazone et acide niflumique provoquent les plus fortes variations alors que l'acide métiazinique en crée de plus faibles.

CHAPITRE IV

ETUDE DE LA LACTATE DESHYDROGENASE AU NIVEAU DU MUSCLE JAMBIER DE LAPIN

I - GENERALITES

Les techniques histochimiques ont permis de révéler la localisation de la lactate deshydrogénase totale, soit celle du groupe d'isoenzymes à déplacement électrophorétique rapide vers l'anode (Iso F : LDH₁ et 2) ou encore celle du groupe d'isoenzymes à déplacement lent (Iso S : LDH₃ et 4) (46).

Dans le muscle squelettique, on distingue l'enzyme mitochondrial et l'enzyme cytoplasmique. Le premier est plus actif dans les fibres rouges et dans les fibres intrafusales et l'Iso S prédomine sur l'Iso F. L'enzyme cytoplasmique est très actif dans les fibres intrafusales, il l'est moins dans les fibres blanches et les fibres rouges. L'activité de la lactate deshydrogénase ne se manifeste au niveau de la plaque motrice que dans des conditions anormales : sous l'influence de l'ésérine, après dénervation ou en anoxémie (46).

La LDH du muscle squelettique formée surtout de LDH₅ est désignée couramment comme fraction musculaire ou fraction M.

PFLEIDERER et WACHSMUTH (95) et CAHN, KAPLAN, LEVINE et ZWILLING (24) ont suggéré que l'isoenzyme M intervenait en milieu anaérobie. D'ailleurs le type M prédomine dans les tissus à métabolisme anaérobie.

La LDH₅ va plutôt catalyser la réaction acide pyruvique $\longrightarrow$ acide lactique. L'activité du type M augmente dans certaines limites, parallèlement à la concentration en pyruvate.

PLAGEMANN, GREGORY et WROBLEWSKI (96) ont trouvé 100 p. 100 de LDH chez le Lapin, alors que WIELAND, PFLEIDERER, HAUPT et WORNER (134) répartissent ainsi les isoenzymes : traces de LDH₁, LDH₂, LDH₃ ; 3 p. 100 de LDH₄ et 95 p. 100 de LDH₅.

Les recherches bibliographiques ne nous ont pas permis de relever des références relatives à l'action des anti-inflammatoires non stéroïques sur la lactate déshydrogénase et les isoenzymes du muscle jambier de Lapin.

II - RECHERCHES EXPERIMENTALES

TABLEAU VII - Activité lactate deshydrogénasique

Pourcentages d'acide pyruvique métabolisé avec les homogénats de muscles jambiers de lapins sacrifiés 28 heures après ingestion d'anti-inflammatoires non stéroïdiques.

Préparations enzymatiques		Nombre de muscles jambiers utilisés	Temps d'incubation (minutes)			
			30		60	
			M	a	M	a
Homogénats dilués au 1/500	Témoin	6	47,5	4,2	66,1	8,6
	Indométacine	6	53,4	3,3	78,7	11,0
	Oxyphenbutazone	6	61,5	5,7	85,4	9,8
	Ac. niflumique	6	50,1	3,6	74,8	10,1
	Ac. métiazinique	6	50,0	2,4	68,6	5,3
Homogénats dilués au 1/3000	Témoin	6	16,4	0,9	28,0	4,7
	Indométacine	6	24,2	2,3	34,0	3,9
	Oxyphenbutazone	6	27,1	2,5	38,6	4,3
	Ac. niflumique	6	23,6	4,1	31,2	2,6
	Ac. métiazinique	6	20,4	2,1	30,8	4,4

<i>Témoin</i>	Poids moyen des lapins	3,500 kg	< P < 4,700 kg
	Poids moyen des muscles	1,833 g	< Pm< 3,928 g
<i>Indométacine</i>	Poids moyen des lapins	4,500 kg	< P < 5,000 kg
	Poids moyen des muscles	2,324 g	< Pm< 3,475 g
<i>Oxyphenbutazone</i>	Poids moyen des lapins	4,100 kg	< P < 4,900 kg
	Poids moyen des muscles	1,948 g	< Pm< 3,119 g
<i>Acide niflumique</i>	Poids moyen des lapins	4,100 kg	< P < 5,600 kg
	Poids moyen des muscles	2,443 g	< Pm< 4,081 g
<i>Acide métiazinique</i>	Poids moyen des lapins	4,000kg	< P < 4,900 kg
	Poids moyen des muscles	1,716 g	< Pm< 3,523 g

ACTION D'ANTI-INFLAMMATOIRES NON STEROIDIQUES SUR
L'ACTIVITE LACTATE DESHYDROGENASIQUE DU MUSCLE JAMBIER DE LAPIN

(Incubation : 30 minutes, homogénats au 1/500)

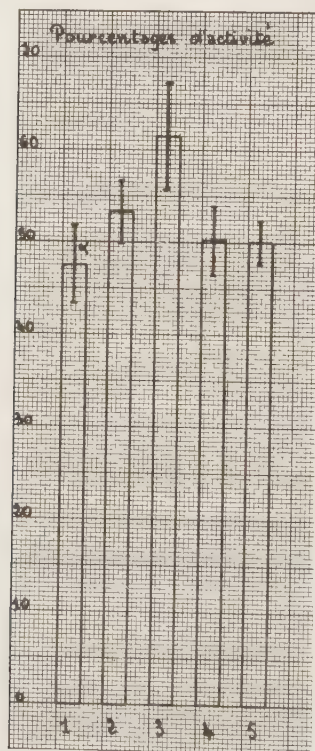


Figure 4

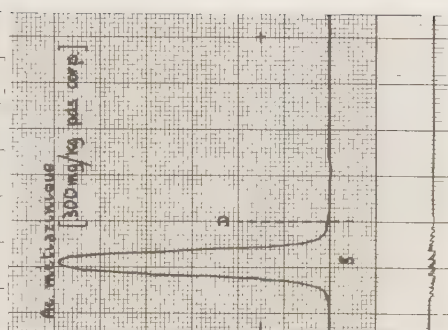
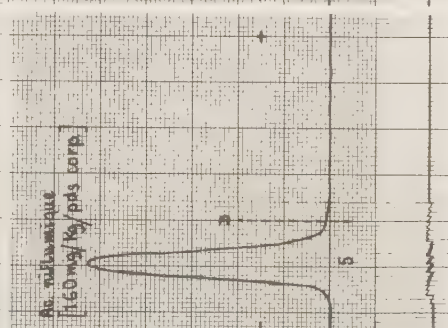
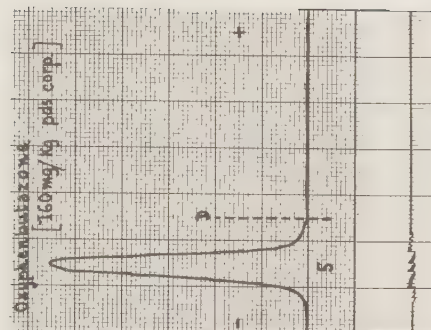
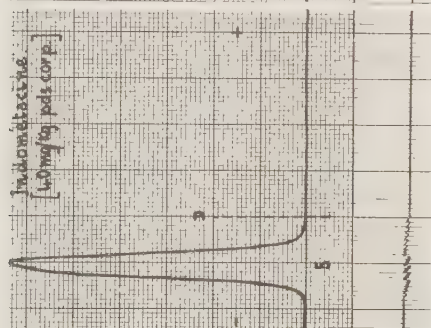
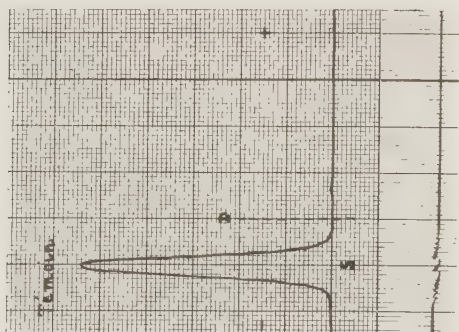
Témoin

Indométacine (40 mg/kg poids corporel)

Oxyphenbutazone (160 mg/kg poids corporel)

Acide niflumique (160 mg/kg poids corporel)

Acide métiазinique (300 mg/kg poids corporel)



ACTION D'ANTI-INFLAMMATOIRES NON STEROÏDIQUES
SUR LES ISOENZYMES DE LA LACTATE DESHYDROGENASE
DU MUSCLE JAMBIER DE LAPIN
(Homogénats au 1/100)

TABLEAU VIII- Action des anti-inflammatoires non stéroïdiens sur la répartition exprimée en pourcentages (*) des isoenzymes de la lactate deshydrogénase du muscle jambier du Lapin.

Isoenzymes	LDH ₁	LDH ₂	LDH ₃	LDH ₄	LDH ₅
Témoin	0	0	0	0	100
Indométacine	0	0	0	0	100
Oxyphenbutazone	0	0	0	0	100
Acide niflumique	0	0	0	0	100
Acide métiazinique	0	0	0	0	100

(*) La LDH₅ étant unique, les variations ne sont pas calculées à partir des pourcentages mais à l'aide des valeurs données par l'intégrateur de surface du densitomètre Microzone Beckman.

III - RESULTATS

1 - Etude globale

L'activité lactate deshydrogénasique décelée par voie biochimique au niveau du muscle jambier chez le Lapin témoin est très intense. Elle est de 47,5 p. 100 pour une incubation de 30 minutes et un homogénat au 1/500 (Tableau VII).

Les essais effectués par voie biochimique chez les animaux traités permettent de déceler pour cet enzyme musculaire, une augmentation de 5,2 à 29,4 p. 100 après traitement par les anti-inflammatoires non stéroïdiques envisagés (Indométacine, oxyphenbutazone, acide niflumique et acide métiazinique).

L'oxyphenbutazone se révèle l'effecteur le plus actif (Tableau VII et figure 4).

2 - Etude différentielle

Après migration électrophorétique, révélation et lecture au densitomètre Microzone Beckman, nous notons la présence d'un seul isoenzyme. Ce dernier a migré vers la cathode, c'est la LDH₅.

Chez le muscle squelettique du Lapin témoin, comme chez le muscle des lapins traités aux anti-inflammatoires non stéroïdiques utilisés (Indométacine, oxyphenbutazone, acide niflumique et acide métiazinique), la LDH₅ représente un pourcentage de 100 p. 100 (Tableau VIII).

Les variations observées ont été calculées à l'aide de l'intégrateur de surface. Ce dernier nous a permis de noter des augmentations de 64,2 p. 100 pour l'indométacine, 28,5 p. 100 pour l'oxyphenbutazone, 64,2 p. 100 pour l'acide niflumique, et 53,5 p. 100 pour l'acide métiazinique. Nous constatons que l'indométacine et l'acide niflumique ont une forte action sur la LDH₅.

CHAPITRE V

ETUDE DE LA LACTATE DESHYDROGENASE DES REINS DE LAPIN

I - GENERALITES

De nombreuses études ont été faites sur la lactate deshydrogénase rénale, en particulier sur la vipère par BASTIDE, LAUMIN et DASTUGUE (11) sur les poissons (*anguilla* et *conger*) par CHIEFFI et BOTTE (27), sur la Grenouille par NATCHIN (80), sur l'embryon du poulet par EPPENBERGER FELLEBERG, RICHTERICH et AEBI (36), sur la Souris par SHAW (113) et chez le Rat par ROSSA (105).

- Chez le Rat et la Souris (7, 8), l'étude histochimique a montré que les reins présentaient une réaction intense sur les formations tubulaires de la corticale, les glomérules étant négatifs. La réaction est également assez forte dans la médullaire externe, sur les portions tubulaires droites (portions initiales des tubes collecteurs, branches ascendantes des anses de Henlé).

- Chez le Lapin, TUBBS et GREVILLE en 1959 (123) étudièrent les propriétés d'une déshydrogénase lactique, obtenue sous forme soluble à partir des mitochondries de rein.

STAVE en 1960 (117) mesura chez le Lapin, les variations de la LDH au cours des premières semaines de la vie. L'activité enzymatique s'élève après la naissance puis diminue après la période néo-natale.

En 1963, KAZIMIERCZAK (65) localise la LDH du rein de Lapin au niveau de l'anse de Henlé, des tubes contournés et des tubes collecteurs.

- Chez l'Homme, ROSALKI et WILKINSON (107) apprécient l'activité urinaire dans les maladies rénales et notent son élévation qu'ils attribuent aux lésions cellulaires dans cet organe.

BONTING, POLLAK, MUEHRCKE et KARK en 1960 (20) recherchent quantitativement la répartition de la LDH dans les reins de l'Homme, du Singe, du Chien, du Rat, du Lapin, de la Grenouille et du Crapaud. L'enzyme est présent dans toutes les parties examinées : les tubes corticaux présentent toujours une activité supérieure à celle des glomérules. Dans les cellules la LDH est presque exclusivement dans le cytoplasme.

PLAGEMANN, GREGORY et WROBLEWSKI (96) répartirent les isoenzymes de la LDH rénale de Lapin de la façon suivante : $LDH_1 = 77$ p. 100, $LDH_2 = 11$ p. 100, $LDH_3 = 7$ p. 100, $LDH_4 = 3$ p. 100 et $LDH_5 = 2$ p. 100, tandis que WIELAND, PFLEIDERER, HAUPT et WORTNER (134) trouvèrent pour la $LDH_1 = 63$ p. 100, la $LDH_2 = 10$ p. 100, la $LDH_3 = 8$ p. 100, la $LDH_4 = 9$ p. 100 et la $LDH_5 = 9$ p. 100.

Nous n'avons relevé aucune référence concernant l'action des anti-inflammatoires non stéroïdiens sur la lactate déshydrogénase et les isoenzymes des reins de Lapin.

II - RECHERCHES EXPERIMENTALES

TABLEAUX IX - Activité lactate deshydrogénasique.

Pourcentages d'acide pyruvique métabolisé avec les homogénats de reins de lapins, sacrifiés 28 heures après ingestion d'anti-inflammatoires non stéroïdiques.

Préparations enzymatiques		Nombre de reins utilisés	Temps d'incubation (minutes)			
			30		60	
			M	a	M	a
Homogénats dilués au 1/1000	Témoin	7	24,4	2,3	44,0	3,8
	Indométacine	7	31,5	2,9	49,5	4,1
	Oxyphenbutazone	7	45,0	3,6	61,4	5,9
	Acide niflumique	7	36,2	4,1	57,4	5,4
	Ac. métiazinique	7	28,2	2,0	48,6	3,7
Homogénats dilués au 1/2000	Témoin	7	14,2	0,9	26,5	1,6
	Indométacine	7	17,5	1,6	25,8	2,5
	Oxyphenbutazone	7	32,2	2,5	39,8	3,0
	Acide niflumique	7	22,0	3,4	35,5	3,1
	Ac. métiazinique	7	16,8	1,3	28,2	1,9

<i>Témoin</i>	Poids moyen des lapins	3,500 kg	< P	<	4,700
	Poids moyen des reins	7,103 g	< Pr	<	10,730
<i>Indométacine</i>	Poids moyen des lapins	4,500 kg	< P	<	5,000
	Poids moyen des reins	7,329 g	< Pr	<	11,098
<i>Oxyphenbutazone</i>	Poids moyen des lapins	4,100 kg	< P	<	4,900
	Poids moyen des reins	6,626 g	< Pr	<	9,423
<i>Acide niflumique</i>	Poids moyen des lapins	4,100 kg	< P	<	5,600
	Poids moyen des reins	7,107 g	< Pr	<	11,317
<i>Acide métiazinique</i>	Poids moyen des lapins	4,000 kg	< P	<	4,900
	Poids moyen des reins	6,476 g	< Pr	<	9,321

ACTION D'ANTI-INFLAMMATOIRES NON STEROIDIQUES SUR
L'ACTIVITE LACTATE DESHYDROGENASIQUE DES REINS DE LAPIN

(Incubation : 60 minutes, homogénats au 1/1000)

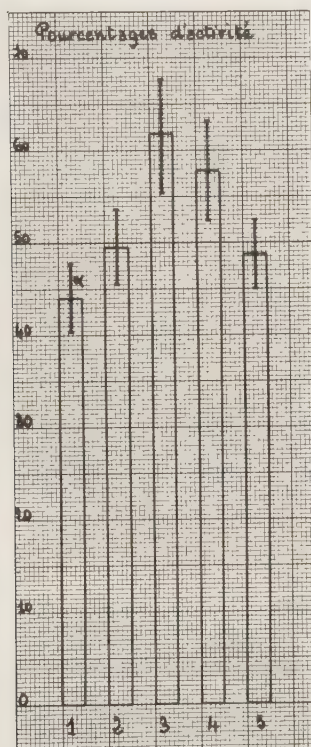
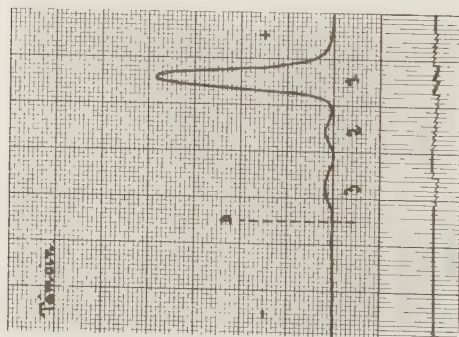


Figure 5

- | | |
|-----------------------|----------------------------|
| 1. Témoins | |
| 2. Indométacine | (40 mg/kg poids corporel) |
| 3. Oxyphenbutazone | (160 mg/kg poids corporel) |
| 4. Acide niflumique | (160 mg/kg poids corporel) |
| 5. Acide métiазinique | (300 mg/kg poids corporel) |



ACTION D'ANTI-INFLAMMATOIRES NON STEROÏDIQUES
SUR LES ISOENZYMES DE LA LACTATE DESHYDROGENASE
DES REINS DE LAPIN

(Homogénats au 1/80)

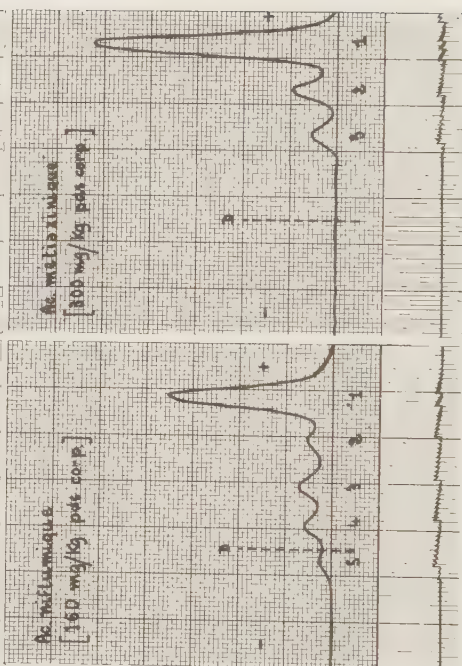
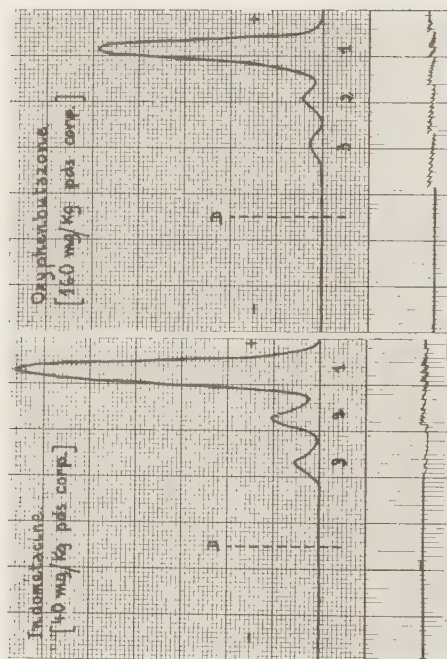


TABLEAU X - Action des anti-inflammatoires non stéroïdiques sur la répartition exprimée en pourcentages, des isoenzymes de la lactate deshydrogénase des reins de Lapin.

Isoenzymes	LDH 1	LDH 2	LDH 3	LDH 4	LDH 5
Témoin	74,3	12,8	12,8	0	0
Indométacine	81,8	13,6	4,5	0	0
Oxyphenbutazone	64,0	18	18	0	0
Acide niflumique	44,4	15,8	15,8	15,8	7,9
Acide métiazinique	66,0	18,8	15,0	0	0

III - RESULTATS

1 - Etude globale

L'étude des résultats relatifs à l'activité lactate deshydrogénasique décelée par voie biochimique au niveau des reins de Lapin témoin, révèle une activité importante : 44,0 p. 100 pour une incubation de 60 minutes et une dilution au 1/1000 (Tableau IX)

Les essais effectués par voie biochimique, chez les animaux traités par les anti-inflammatoires étudiés (Indométacine, oxyphenbutazone, acide niflumique et acide métiazinique) nous permettent de conclure à une augmentation générale de 10,4 p. 100 à 39,5 p. 100. L'oxyphenbutazone agit le plus fortement (Tableau IX, figure 5).

2 - Etude différentielle

- Chez les lapins témoins, la répartition des différents isoenzymes s'établit ainsi : $LDH_1 = 74,3$ p. 100, $LDH_2 = 12,8$ p. 100 et $LDH_3 = 12,8$ p. 100, LDH_4 et $LDH_5 = 0$ p. 100 (Tableau X).

- Chez les lapins traités, l'analyse de la répartition des isoenzymes des reins de Lapin nous permet de noter :

pour l'indométacine :

- une légère augmentation de la $LDH_1 = 10,0$ p. 100 et de la $LDH_2 = 6,2$ p. 100.

- une diminution de $64,8$ p. 100 de la LDH_3 .

pour l'oxyphenbutazone :

- une légère diminution de $13,8$ p. 100 de la LDH_1 .

- une augmentation de $40,6$ p. 100 pour la LDH_2 et la LDH_3 .

pour l'acide niflumique :

- une diminution de $40,2$ p. 100 de la LDH_1

- une augmentation de $23,4$ p. 100 de la LDH_2 et LDH_3 .

- l'apparition de la $LDH_4 = 15,8$ p. 100 et la $LDH_5 = 7,9$ p. 100

- pour l'acide métiazinique :

- une légère diminution de $11,1$ p. 100 de la LDH_1

- une augmentation de $46,8$ p. 100 de la LDH_2 et de $17,1$ p. 100 de la LDH_3 .

En conclusion, l'oxyphenbutazone s'est montré l'agent le plus actif sur la lactate deshydrogénase. L'acide niflumique possède aussi une action importante, légèrement inférieure à l'oxyphenbutazone.

Sous l'action des anti-inflammatoires non stéroïdiques, nous observons des modifications de l'électrophorégramme. La LDH_1 subit en général une diminution alors que la LDH_2 et la LDH_3 augmentent. L'acide niflumique s'est montré l'effecteur le plus actif.

CHAPITRE VI

ETUDE DE LA LACTATE DESHYDROGENASE DES GLANDES SURRENALES DE LAPIN

I - GENERALITES

La localisation histochimique (60) faite selon la technique de HESS, SCARPELLI et PEARSE (56) modifiée par OGATA et MORI (85) a permis de noter une réaction positive sur tout le cortex avec une prédominance dans la zone glomérulée sur des structures finement granulaires cytoplasmiques.

L'activité lactate deshydrogénasique des glandes surrénales a été étudiée chez plusieurs espèces animales.

- Chez le Rat, LEVY et coll. (69, 70) remarquent que le cortex surrénal oxyde rapidement le lactate de sodium, ces auteurs notent une diminution du taux de cet enzyme après hypophysectomie, néanmoins, une activité assez importante persiste dans tout le cortex avec une prévalence dans la zone externe de la fasciculée et de la glomérulée.

- Chez le Lapin, DIECKHOFF et coll. (31) n'ont pas observé de changement du taux de l'enzyme au niveau des surrénales, dans les cas de néphrites expérimentales. Par contre, IHARA (59) a noté une baisse de l'activité enzymatique dans le cas du diabète mellitique expérimental.

- Chez le Boeuf, ARVY (5) a montré que d'une façon générale la zone corticale était riche en deshydrogénase alors qu' une activité très faible était notée au niveau de la médullo surrénale.

- Chez le fœtus humain, ANDERSEN (2) a montré que l'ébauche surrénaliennne possédait déjà cette activité enzymatique.

Chez l'Homme, MORI et coll. (79) ont étudié la distribution de la lactate deshydrogénase par voie histochimique, dans les cas de tumeurs surrénaliennes, au niveau des cellules néoplasiques.

L'action des anti-inflammatoires non stéroïdiques sur la lactate deshydrogénase des glandes surrénales de Lapin a fait l'objet de travaux effectués dans ce Laboratoire.

JONADET et BASTIDE (60) ont relevé une baisse modérée de 13 à 23 p. 100 après traitement par les anti-inflammatoires suivants : indométacine, oxyphenbutazone et acide niflumique. L'indométacine s'est révélé l'effecteur le plus actif.

De même, ces auteurs ont à montré que l'indométacine provoquait les variations les plus sensibles sur les isoenzymes de la lactate deshydrogénase (60).

II - RECHERCHES EXPERIMENTALES

TABLEAU XI - Activité lactate deshydrogénasique

Pourcentages d'acide pyruvique métabolisé avec les homogénats de glandes surrénales de lapins sacrifiés 28 heures après ingestion d'anti-inflammatoires non stéroïdiques.

Préparations enzymatiques		Nombre de surrénales utilisées	Temps d'incubation (minutes)			
			30		60	
			M	a	M	a
Homogénats dilués au 1/500	Témoin	7	35,7	0,5	67,7	2,8
	Indométacine	7	27,5	2,5	51,3	2,5
	Oxyphenbutazone	7	31,0	3,6	54,0	3,1
	Ac.niflumique	7	29,2	4,7	53,1	3,3
	Ac. métiazinique	7	34,0	1,5	60,0	3,7
Homogénats dilués au 1/1000	Témoin	7	16,8	1,2	22,4	2,0
	Indométacine	7	11,2	2,6	14,7	3,0
	Oxyphenbutazone	7	15,2	0,5	20,9	1,7
	Ac. niflumique	7	15,2	4,2	20,7	2,3
	Ac. métiazinique	7	16,5	0,8	21,2	3,9

<i>Témoin</i>	Poids moyen des lapins	3,500 kg	< P < 4,700 kg
	Poids moyen des surrénales	0,435 g	< Ps < 0,715 g
<i>Indométacine</i>	Poids moyen des lapins	4,500 kg	< P < 5,000 kg
	Poids moyen des surrénales	0,416 g	< Ps < 0,873 g
<i>Oxyphenbutazone</i>	Poids moyen des lapins	4,100 kg	< P < 4,900 kg
	Poids moyen des surrénales	0,344 g	< Ps < 0,567 g
<i>Acide niflumique</i>	Poids moyen des lapins	4,100 kg	< P < 5,600 kg
	Poids moyen des surrénales	0,458 g	< Ps < 0,729 g
<i>Acide métiazinique</i>	Poids moyen des lapins	4,000 kg	< P < 4,900 kg
	Poids moyen des surrénales	0,400 g	< Ps < 0,683 g

ACTIVITE D'ANTI-INFLAMMATOIRES NON STEROIDIQUES
L'ACTIVITE LACTATE DESHYDROGENASIQUE DES GLANDES SURREN

(Incubation : 60 minutes, homogénats au 1/500

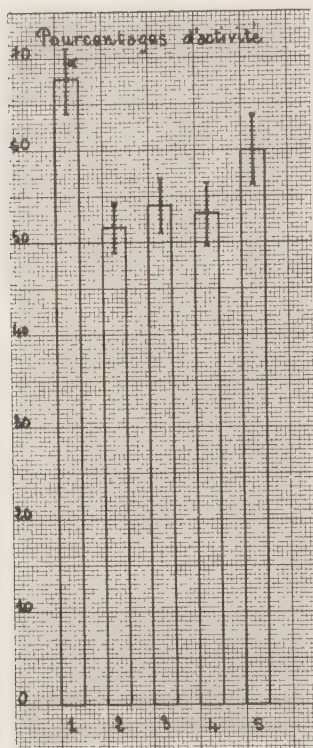
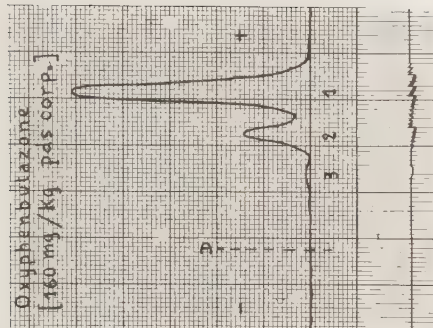
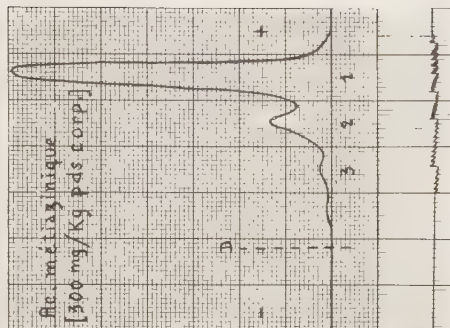
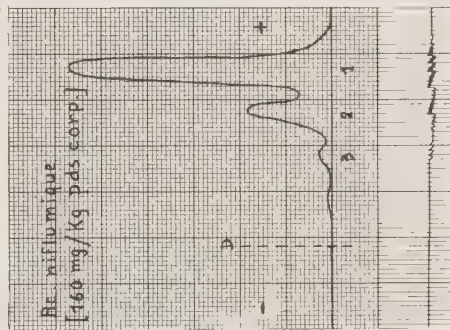
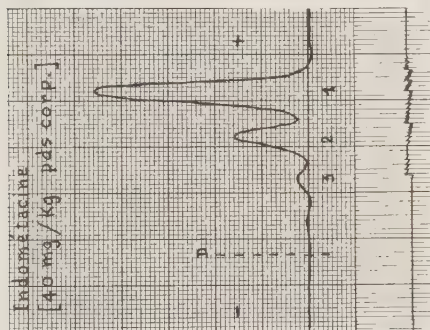
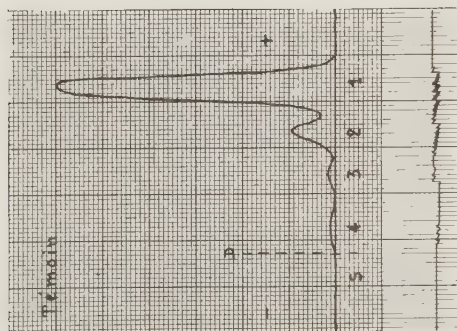


Figure 6

1. Témoin
2. Indométacine (40 mg/kg poids corporel)
3. Oxyphenbutazone (160 mg/kg poids corporel)
4. Acide niflumique (160 mg/kg poids corporel)
5. Acide métiazinique (300 mg/kg poids corporel)



ACTION D'ANTI-INFLAMMATOIRES NON STEROÏDIQUES
SUR LES ISOENZYMES DE LA LACTATE DESHYDROGENASE
DES GLANDES SURRÉNALES DE LAPIN
(Homogenats au 1/20)

TABLEAU XII - Action des anti-inflammatoires non stéroïdiques sur la répartition exprimée en pourcentages, des isoenzymes de la lactate deshydrogénase des glandes surrénales de Lapin.

Isoenzymes	LDH 1	LDH 2	LDH 3	LDH 4	LDH 5
Témoin	74,5	20,0	5,5	trace	0
Indométacine	63,5	27,3	9,1	0	0
Oxyphenbutazone	75	22,5	2,5	0	0
Acide niflumique	69,1	22,5	5,4	0	0
Acide métiazinique	73,0	21,5	5,5	0	0

III - RESULTATS

1 - Etude globale

L'activité lactate deshydrogénasique décelée par voie biochimique au niveau des glandes surrénales, chez le Lapin témoin est importante. Cette activité a une valeur de 35,7 p. 100 pour une incubation de 30 minutes et un homogénat au 1/500 (Tableau XI).

Les dosages biochimiques effectués chez les animaux traités permettent de déceler pour cet enzyme surrénalien une diminution de 11,3 p. 100 à 24,2 p.100 après traitement par les anti-inflammatoires non stéroïdiques utilisés (indométacine, oxyphenbutazone, acide niflumique et acide métiazinique). L'indométacine est l'effecteur le plus actif alors que l'acide métiazinique n'a pratiquement pas modifié l'activité enzymatique (Tableau XI, figure 6).

2 - Etude différentielle

- Chez le Lapin témoin, les isoenzymes de la lactate deshydrogénase se répartissent de la façon suivante, la LDH₁ = 74,5 p. 100, la LDH₂ = 20,0 p. 100, la LDH₃ = 5,5 p. 100, la LDH₄ est négligeable et la LDH₅ est absente (Tableau XII).

- Chez les lapins traités, l'examen de la répartition des isoenzymes de la lactate deshydrogénase des glandes surrénales de Lapin nous permet de noter :

- pour l'indométacine

- une diminution de 14,7 p. 100 de la LDH₁
- une augmentation de 36,5 p. 100 de la LDH₂ et de 65,4 p. 100 de la LDH₃.
- la disparition de la LDH₄.

- pour l'oxyphenbutazone

une très faible augmentation de 0,6 p. 100 de la LDH₁ et de 12,5 p. 100 de la LDH₂.

- une diminution de 54,5 p. 100 de la LDH₃.
- la disparition de la LDH₄.

- pour l'acide niflumique :

- une diminution de 7, 2 P.100 de la LDH₁ et de 1,8 p. 100 de la LDH₃.
- une augmentation de 27,5 p. 100 de la LDH₂
- la disparition de la LDH₄.

pour l'acide métiazinique

- une légère diminution de 2,0 p. 100 de la LDH₁.
- une augmentation de 7,5 p. 100 de la LDH₂.
- la disparition de la LDH₄.

Les anti-inflammatoires non stéroïdiques employés, possèdent une légère action inhibitrice sur l'activité lactate deshydrogénasique des glandes surrénales de Lapin. L'indométacine provoque les plus fortes variations.

La comparaison des électrophorégrammes ne nous a pas permis de noter d'importantes modifications d'une façon générale, nous remarquons une légère baisse de la LDH₁, une augmentation de la LDH₂ et la disparition de la LDH₄. L'indométacine semble causer les plus grandes variations.

CHAPITRE VII

ETUDE DE LA LACTATE DESHYDROGENASE DU SERUM DE LAPIN

I - GENERALITES

D'après VAN DER HELM (54) le sérum humain contient les fractions suivantes de la lactate deshydrogénase : L.D.H.₁ = 43,6 p. 100, L.D.H.₂ = 41,1 p. 100, L.D.H.₃ = 12,1 p. 100, L.D.H.₄ = 3,2 p. 100 et L.D.H.₅ = 0 p. 100.

Dans les cas de nécrose tissulaire , la lactate deshydrogénase est libérée dans le courant circulatoire. Ce qui permet théoriquement de déterminer par l'étude des fractions de la lactate deshydrogénase retrouvées, dans quel tissu la nécrose s'est produite. Cette application théorique, devenue réalité permet aujourd'hui de parler des applications cliniques de la détermination des isoenzymes de la lactate deshydrogénase.

WIEME et VAN MAERCKE (139, 140) utilisèrent la lactate deshydrogénase et ses isoenzymes pour différencier un infarctus du myocarde d'une péri-cardie bénigne.

WIEME et DEMEULENAERE (138) montrèrent qu'une augmentation de la L.D.H.₅ était constatée chez les patients atteints d'une nécrose hépatique aiguë.

Chez l'Homme, RINGOIR et coll. en 1964 (104), puis RINGOIR et WIEME en 1965 (137) ont mis en évidence des modifications sériques des isoenzymes dues à des néphropathies. Il est observé parfois, dans les cas de nécrose tubulaire aiguë une élévation sérique de la L.D.H.₅.

WIEME (136) a aussi rapporté dans les cas d'anémie pernicieuse une augmentation des isoenzymes 1, 2, et 3.

GARBUS et coll. en 1964 (45) signalèrent chez le Rat, après un exercice physique, une augmentation générale des cinq isoenzymes de la lactate deshydrogénase. Ce qui prouve que la lactate deshydrogénase du muscle squelettique n'est pas la seule à être libérée dans le sang.

De même, chez le Chien, VESELL et coll. (127) ont noté une élévation non spécifique des quatre isoenzymes de la L.D.H. à la suite d'un choc hémorragique.

L'étude bibliographique ne nous a pas permis de relever des références relatives à l'action des anti-inflammatoires non stéroïdiques sur la lactate deshydrogénase et de ses isoenzymes du serum de Lapin.

II - RECHERCHES EXPERIMENTALES

TABLEAU XIII - Activité lactate deshydrogénasique

Pourcentages d'acide pyruvique métabolisé avec les plasmas de lapins, sacrifiés 28 heures après ingestion d'anti-inflammatoires non stéroïdiques.

Préparations enzymatiques		Nombre de plasmas utilisés	Temps d'incubation (minutes)			
			30		60	
			M	a	M	a
Plasmas 1/5	Témoin	6	24,0	1,2	29,5	2,6
	Indométacine	6	32,2	2,0	45,4	3,9
	Oxyphenbutazone	6	33,0	2,5	46,2	4,3
	Ac. niflumique	6	32,2	1,6	42,2	4,0
	Ac. métiazinique	6	19,6	0,9	28,4	2,7
Plasmas 1/10	Témoin	6	21,5	1,5	27,3	2,8
	Indométacine	6	23,5	1,7	33,0	3,2
	Oxyphenbutazone	6	25,3	2,1	35,2	3,5
	Ac. niflumique	6	24,2	0,8	34,2	2,0
	Ac. métiazinique	6	13,6	0,4	19,4	0,9

<i>Témoin</i>	Poids moyen des lapins	3,500 kg	< P	< 4,700 kg
<i>Indométacine</i>	Poids moyen des lapins	4,500 kg	< P	< 5,000 kg
<i>Oxyphenbutazone</i>	Poids moyen des lapins	4,100 kg	< P	< 4,900 kg
<i>Acide niflumique</i>	Poids moyen des lapins	4,100 kg	< P	< 5,600 kg
<i>Acide métiazinique</i>	Poids moyen des lapins	4,000 kg	< P	< 4,900 kg

ACTION D'ANTI-INFLAMMATOIRES NON STEROIDIQUES SUR
L'ACTIVITE LACTATE DESHYDROGENASIQUE DU PLASMA DE LAPIN

(Incubation : 60 minutes, dilution au 1/5)

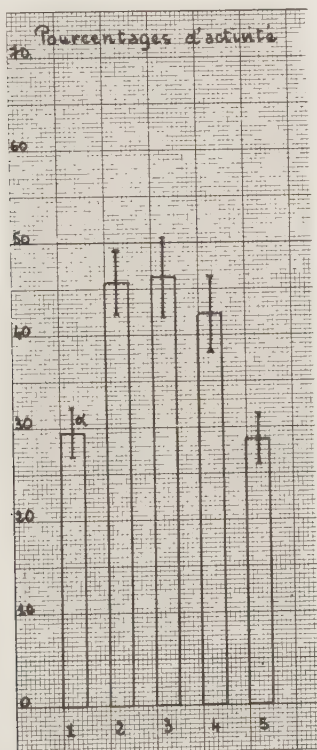
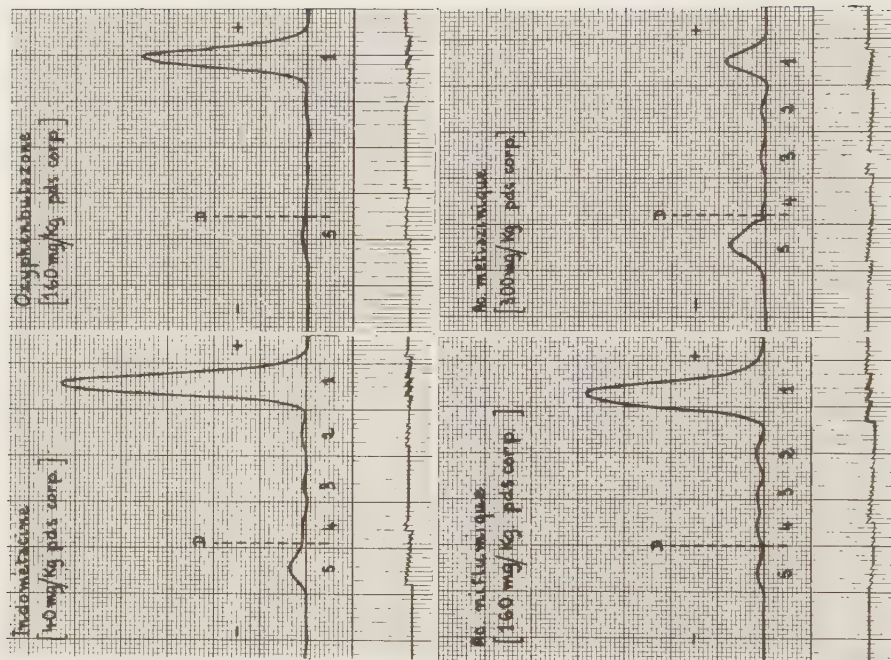
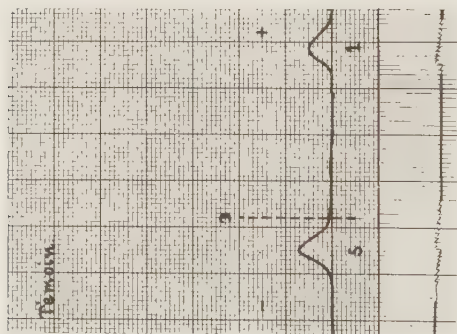


Figure 7

1. Témoin
2. Indométacine (40 mg/kg poids corporel)
3. Oxyphenbutazone (160 mg/kg poids corporel)
4. Acide niflumique (160 mg/kg poids corporel)
5. Acide métiazinique (300 mg/kg poids corporel)



ACTION D'ANTI-INFLAMMATOIRES NON STÉROÏDIQUES
SUR LES ISOENZYMES DE LA LACTATE DESHYDROGENASE
DU SÉRUM DE LAPIN

(Dilutions 1/2)

TABLEAU XIV - Action des anti-inflammatoires non stéroïdiques sur la répartition exprimée en pourcentages, des isoenzymes de la lactate deshydrogénase du sérum de Lapin.

Isoenzymes	LDH 1	LDH 2	LDH 3	LDH 4	LDH 5
Témoin	42,3	0	0	0	57,6
Indométacine	68	8	0	8	16
Oxyphenbutazone	80	0	0	0	20
Acide niflumique	66,6	6,2	10,5	10,5	6,2
Acide métiazinique	32,4	13,5	13,5	2,7	37,8

III - RESULTATS

1 - Etude globale

L'activité lactate deshydrogénasique du plasma de Lapin témoin décelée par voie biochimique est intense. Pour une incubation de 30 minutes et une dilution au 1/5, nous avons trouvé 24,0 p. 100 (Tableau XIII).

Les dosages biochimiques chez les animaux traités par les anti-inflammatoires non stéroïdiques ont permis d'observer une augmentation de 43,3 p. 100 à 56,6 p. 100 pour les agents suivants : indométacine, oxyphenbutazone et acide niflumique. Par contre, nous avons noté une très légère diminution de 3,7 p. 100 pour l'acide métiazinique (Tableau XIII, figure 7).

2 - Etude différentielle

- Chez les lapins témoins, l'analyse de l'électrophorégramme des isoenzymes de la lactate deshydrogénase nous permet d'établir la répartition suivante : L.D.H.₁ = 42,3 p. 100, L.D.H.₂, L.D.H.₃ et L.D.H.₄ inexistantes et la L.D.H.₅ = 57,6 p. 100 (Tableau XIV).

- Chez les lapins traités aux anti-inflammatoires non stéroïdiques nous observons :

pour l'indométacine :

- une agumentation de 60,7 p. 100 pour la L.D.H.1
- une diminution de 72,2 p. 100 pour la L.D.H.5
- l'apparition de la L.D.H.2 (8 p. 100) et la L.D.H.4 (8 p. 100)

pour l'oxyphenbutazone

- une augmentation de 89,1 p. 100 de la L.D.H.1
- une diminution de 65,2 p. 100 de la L.D.H.5

pour l'acide niflumique

- une augnmentation de 57,4 p. 100 de la L.D.H.1
- une diminution de 89,2 p. 100 de la L.D.H.5
- l'apparition de la L.D.H.2 (6,2 p. 100) de la L.D.H.3 (10,5 p. 100) et de la L.D.H.4 (10,5 p. 100).

pour l'acide métiazinique

- une diminution de 23,4 p. 100 de la L.D.H.1 et de 34,3 p. 100 de la L.D.H.5
- l'apparition de la L.D.H.2 (13,5 p. 100) de la L.D.H.3 (13,4 p. 100) et de la L.D.H.4 (2,7 p. 100).

En conclusion, nous voyons que le traitement par les anti-inflammatoires non stéroïdiques provoquent une augmentation de l'activité de la lactate deshydrogénase. L'oxyphenbutazone cause la plus forte variation alors que l'acide métiazinique n'apporte qu'une très faible modification.

L'examen des variations des différents isoenzymes de la lactate deshydrogénase dues au traitement par les anti-inflammatoires non stéroïdiques nous permet de noter d'une façon générale une augmentation de la L.D.H.1, l'apparition des isoenzymes 2, 3, 4 et une baisse du pourcentage de la L.D.H.5 par rapport au témoin.

CHAPITRE VIII

ETUDE DE LA LACTATE DESHYDROGENASE DES HEMATIES DE LAPIN

I - GENERALITES

OTTOLENGHI et DENSTEDT (88) en 1958 ont signalé le fait que la lactate deshydrogénase des hématies de Lapin agissait aussi bien sur le D (-) lactate que sur le L (+) lactate, ce dernier étant le substrat spécifique de la LDH. PLAGEMAN et coll. (96) n'ont pas retrouvé cette double action et ont seulement observé l'action enzymatique sur le L (+) lactate.

Chez l'Homme, WIEME (135, 136) répartit les isoenzymes de la lactate deshydrogénase ainsi : L.D.H.1 = 39 p. 100, L.D.H.2 = 56 p. 100, L.D.H.3 = 5 p. 100, L.D.H.4 et L.D.H.5 à l'état de trace. Occasionnellement la L.D.H.4 peut être présente.

VESELL et BEARN (126) ont montré que certaines espèces ayant des érythrocytes nucléés, possédaient l'isoenzyme L.D.H.5.

ROSA et SCHAPIRA (106) signalèrent que les jeunes cellules érythrocytaires humaines contenaient relativement plus d'isoenzymes L.D.H.3 et L.D.H.4 que les érythrocytes adultes.

Chez le Lapin, PLAGEMAN et coll. (96) n'ont trouvé qu'un seul isoenzyme : la L.D.H.1. Les isoenzymes L.D.H.2, L.D.H.3, L.D.H.4 et L.D.H.5 n'existent pas.

GLENN et BOWMAN (48) ont étudié certaines actions, in vitro, des anti-inflammatoires non stéroïdiques (AINS) en particulier, sur les érythrocytes de Rat et sur la lactate deshydrogénase des plaquettes sanguines.

Ces auteurs ont montré que les anti-inflammatoires non stéroïdiques inhibaient la lyse des érythrocytes due à l'hypotonie et à l'hyperthermie.

Ils ont aussi mis en évidence l'action de l'indométacine et de la phénylbutazone sur les plaquettes sanguines. Normalement en présence de thrombine, le calcium est nécessaire pour une libération maximale de la lactate deshydrogénase et de la phosphatase acide (ACP ase) des plaquettes. Le temps nécessaire est de trente minutes. L'indométacine et la phénylbutazone empêchent la libération des deux enzymes : L.D.H. et ACPase. Les effets sont liés aux concentrations médicamenteuses.

GLENN (49) a émis l'hypothèse que peut-être cette action était due à l'effet protecteur de la membrane des anti-inflammatoires non stéroïdiques.

Les auteurs ont comparé l'action in vitro, et in vivo, de ces produits. Ils ont constaté qu'il n'y avait pas de relation directe.

II - RECHERCHES EXPERIMENTALES

TABLEAU XV - Activité lactate deshydrogénasique.

Pourcentage d'acide pyruvique métabolisé avec les hématies de lapins, sacrifiés 28 heures après ingestion d'anti-inflammatoires non stéroïdiques.

Préparations enzymatiques		Nombre de dosages effectués	Temps d'incubation (minutes)			
			30		60	
			M	a	M	a
Homogénats dilués au 1/200	Témoin	6	64,8	5,4	77,2	8,2
	Indométacine	6	46,9	4,8	61,9	7,3
	Oxyphenbutazone	6	42,3	3,7	60,3	5,8
	Ac. niflumique	6	63,7	6,1	75,0	9,1
	Ac. métiazinique	6	62,5	5,8	74,5	7,0
Homogénats dilués au 1,400	Témoin	6	40,0	2,7	61,5	5,6
	Indométacine	6	24,0	1,8	37,2	4,1
	Oxyphenbutazone	6	20,2	2,3	36,6	3,8
	Ac. niflumique	6	39,5	4,1	61,2	6,3
	Ac. métiazinique	6	39,1	2,4	60,5	5,8

<i>Témoin</i>	Poids moyen des lapins	3,500 kg	< P	< 4,700 kg
<i>Indométacine</i>	Poids moyen des lapins	4,500 kg	< P	< 5,000 kg
<i>Oxyphenbutazone</i>	Poids moyen des lapins	4,100 kg	< P	< 4,900 kg
<i>Ac. niflumique</i>	Poids moyen des lapins	4,100 kg	< P	< 5,600 kg
<i>Ac. métiazinique</i>	Poids moyen des lapins	4,000 kg	< P	< 4,900 kg

ACTION D'ANTI-INFLAMMATOIRES NON STEROIDIQUES SUR
L'ACTIVITE LACTATE DESHYDROGENASIQUE DES HEMATIES DE LAPIN

(Incubation : 30 minutes, dilution : 1/200)

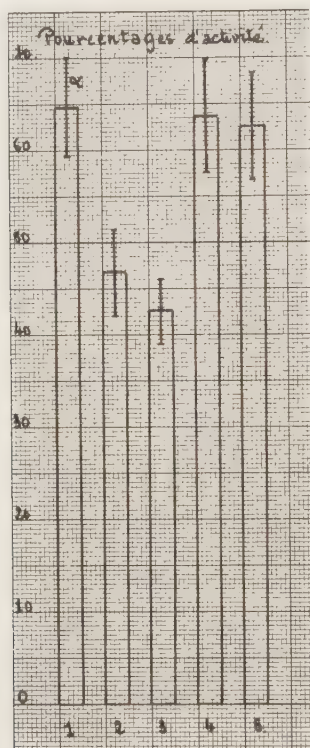


Figure 8

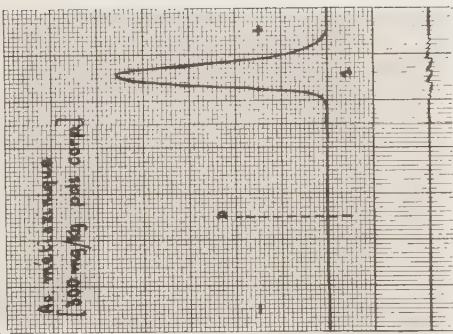
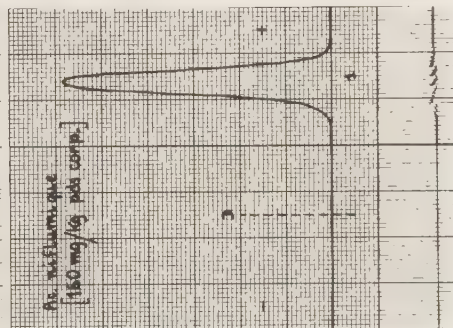
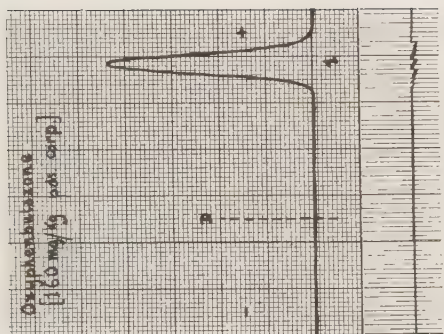
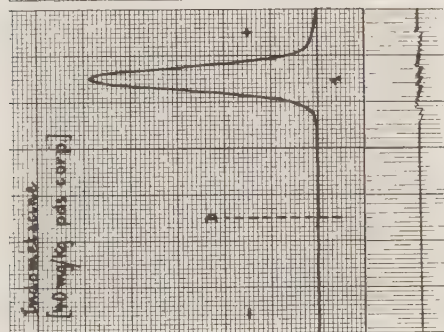
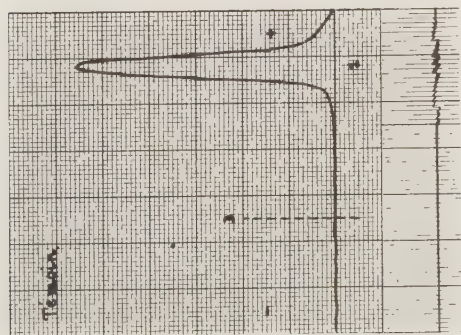
Témoin

Indométacine (40 mg/kg poids corporel)

Oxyphenbutazone (160 mg/kg poids corporel)

Acide niflumique (160 mg/kg poids corporel)

Acide métiazinique (300 mg/kg poids corporel)



ACTION D'ANTI-INFLAMMATOIRES NON STEROÏDIQUES
SUR LES ISOENZYMES DE LA LACTATE DESHYDROGENASE
DES HÉMATIES DE LAPIN

(Homogénats au 1/20)

TABLEAU XVI - Action des anti-inflammatoires non stéroïdiques sur la répartition exprimée en pourcentages, des isoenzymes de la lactate deshydrogénase des hématies de Lapin.

Isoenzymes	LDH 1	LDH 2	LDH 3	LDH 4	LDH 5
Témoin	100	0	0	0	0
Indométacine	100	0	0	0	0
Oxyphenbutazone	100	0	0	0	0
Acide niflumique	100	0	0	0	0
Acide métiazinique	100	0	0	0	0

(*) La LDH₁ étant unique, les variations ne sont pas calculées à partir des pourcentages mais à l'aide des valeurs données par l'intégrateur de surface du densitomètre Microzone Beckman.

III - RESULTATS

1 - Etude globale

L'examen des dosages enzymatiques de la lactate deshydrogénase des hématies de Lapin témoin a permis de déceler une activité importante de cet enzyme. Nous avons trouvé 64,8 p. 100 pour une incubation de 30 minutes et une dilution au 1/200 (Tableau XV).

Chez les lapins traités aux anti-inflammatoires non stéroïdiques nous avons observé une baisse générale de 1,6 p. 100 à 34,7 p. 100 de l'activité lactate deshydrogénasique. L'oxyphenbutazone cause les variations les plus sensibles alors que les acides niflumique et métiazinique n'apportent que de très faibles modifications (Tableau XV, figure 8).

2 - Etude différentielle

- Chez le Lapin témoin, nous avons noté la présence d'un seul isoenzyme de la lactate deshydrogénase : la L.D.H.₁. Cette dernière étant seule, représente un pourcentage de 100 p. 100 (Tableau XVI).

- Chez les lapins traités aux anti-inflammatoires non stéroïdiques, nous avons étudié les différentes variations à l'aide des résultats donnés par l'intégrateur de surface.

Nous avons constaté :

pour l'indométacine

- une diminution de 14,5 p. 100

pour l'oxyphenbutazone

- une diminution de 43,7 p. 100

pour l'acide niflumique

- une diminution de 20,8 p. 100

pour l'acide métiazinique

- une diminution de 33,3 p. 100

En conclusion :

Le traitement par les anti-inflammatoires non stéroïdiques provoque une baisse générale de l'activité lactate deshydrogénasique des hématies de Lapin. La modification la plus importante est due à l'oxyphenbutazone.

De même, pour l'isoenzyme de la lactate deshydrogénase des hématies de Lapin, l'oxyphenbutazone s'est montré le plus actif.

Remarque : Comparaison des actions des anti-inflammatoires non stéroïdiques sur les LDH des hématies et du plasma de Lapin.

Après traitement aux anti-inflammatoires non stéroïdiques, nous avons noté pour les hématies de Lapin, une baisse générale de l'activité lactate deshydrogénasique, cette dernière étant la plus forte lorsque les animaux sont traités par l'oxyphenbutazone.

Par contre, ce même traitement, nous a permis de constater pour le plasma de Lapin, une augmentation générale de l'activité de la lactate deshydrogénase. Là aussi, l'oxyphenbutazone s'est montré l'agent le plus actif.

Nous pouvons supposer que les anti-inflammatoires non stéroïdiques ont provoqué un départ de la lactate deshydrogénase des hématies vers le plasma en agissant sur la membrane protectrice des érythrocytes. Ceci pourrait expliquer les différentes variations observées.

RESUME ET CONCLUSIONS GENERALES

Au début de ce travail, nous avons rapporté quelques généralités sur la lactate deshydrogénase et ses isoenzymes ainsi que sur les anti-inflammatoires non stéroïdiques expérimentés : indométacine, oxyphenbutazone, acides niflumique et métiazinique.

Dans une deuxième partie, nous avons exposé le protocole général d'expérimentation, le dosage de la lactate deshydrogénase ainsi que la méthode de séparation de ses isoenzymes.

Les résultats expérimentaux, obtenus à partir des dosages effectués sur les différents organes (cerveau, coeur, foie, muscle jambier, reins, glandes surrénales, sérum et hématies) des animaux traités par les quelques anti-inflammatoires non stéroïdiques nous ont permis de constater :

Pour le cerveau :

Activité lactate deshydrogénasique totale :

- une légère diminution de 2,2 p. 100 à 6,8 p. 100 de l'activité enzymatique due aux drogues suivantes : indométacine, oxyphenbutazone et acide niflumique.
- une diminution de 17,7 p. 100 causée par l'acide métiazinique.

L'oxyphenbutazone d'une part, et l'acide métiazinique d'autre part se sont montrés les plus actifs.

Répartition isoenzymatique :

- une augmentation importante des pourcentages des isoenzymes L.D.H.1, L.D.H.2 et L.D.H.3.
 - une diminution des isoenzymes L.D.H.4 et L.D.H.5.
- L'indométacine a créé les plus fortes modifications.

- Pour le coeur

Activité lactate deshydrogénasique totale :

- une légère augmentation de 1,8 p. 100 à 3,6 p. 100 due à l'oxyphenbutazone et l'acide niflumique.
- une diminution de 7,2 p. 100 à 8,5 p. 100 causée par l'indométacine et l'acide métiazinique.

Répartition isoenzymatique :

- une augmentation de 37,1 p. 100 de l'isoenzyme L.D.H.1 due à l'oxyphenbutazone.
- une diminution de 22,8 p. 100 de ce même isoenzyme causée par l'acide métiazinique.

L'oxyphenbutazone crée la plus forte variation

- Pour le foie :

Activité lactate deshydrogénasique totale :

- une augmentation générale de 1,0 p. 100 à 21,8 p. 100. La plus importante est provoquée par l'oxyphenbutazone.

Répartition isoenzymatique :

- une augmentation des isoenzymes L.D.H.3 et L.D.H.4
- une diminution de l'isoenzyme L.D.H.5.

L'indométacine, l'oxyphenbutazone et l'acide niflumique créent les plus fortes variations alors que l'acide métiazinique n'en provoque que de très faibles.

- Pour le muscle jambier :

Activité lactate deshydrogénasique totale :

- une augmentation générale de 5,2 p. 100 à 29,4 p. 100 due aux quatre produits essayés. L'oxyphenbutazone possède la plus forte action.

Répartition isoenzymatique :

- une augmentation générale de l' isoenzyme L.D.H.5de 28,5 p. 100 à 64,2 p. 100.

L'acide niflumique et l'indométacine se sont révélés les effecteurs les plus puissants.

- Pour les reins :

Activité lactate deshydrogénasique totale :

- une augmentation générale de 10,4 p. 100 à 39,5 p. 100.

L'oxyphenbutazone est la drogue causant la plus grande variation l'acide niflumique possède cependant une action légèrement inférieure.

Répartition isoenzymatique :

- une augmentation des pourcentages des isoenzymes L.D.H.2 et L.D.H.3
- une diminution de l'isoenzyme L.D.H.1.

- Pour les glandes surrénales :

Activité lactate deshydrogénasique totale :

- une diminution de 11,3 p. 100 à 24,2 p. 100.

L'indométacine s'est montré l'effecteur le plus actif alors que l'acide métiazinique n'a pratiquement pas modifié l'activité enzymatique.

Répartition isoenzymatique :

- une légère baisse de la L.D.H.1
- une augmentation de la L.D.H.2
- la disparition de la L.D.H.4

Les anti-inflammatoires non stéroïdiques n'ont pas provoqué de grosses variations. Les plus importantes sont causées par l'indométacine.

- Pour le sérum :

Activité lactate deshydrogénasique totale :

- une augmentation de 43,3 p. 100 à 56,6 p. 100 due au traitement des lapins par les anti-inflammatoires suivants : indométacine, oxyphenbutazone et acide niflumique.

- une légère diminution de 3,7 p. 100 causée par l'acide métiazinique.

Répartition isoenzymatique :

- une augmentation de la L.D.H.1
- l'apparition des isoenzymes L.D.H.2, L.D.H.3 et L.D.H.4.
- une baisse de pourcentage de la L.D.H.5 par rapport au témoin.

- Pour les hématies :

Activité lactate deshydrogénasique totale :

- une baisse générale de 1,6 p. 100 à 34,7 p. 100.

L'oxyphenbutazone cause les variations les plus sensibles alors que les acides niflumique et métiazinique n'apportent que de très faibles changements.

Répartition isoenzymatique :

- une diminution de 14,5 p. 100 à 43,7 p. 100, la plus forte étant provoquée par l'oxyphenbutazone.

De tous ces résultats, nous remarquons d'une part que les anti-inflammatoires non stéroïdiques modifient l'activité enzymatique de la lactate deshydrogénase soit en l'augmentant, soit en l'inhibant, d'autre part les quatre produits utilisés n'ont pas la même intensité d'action. Si nous avions à les classer de ce point de vue, nous placerions l'oxyphenbutazone en tête, suivi de l'indométacine et de l'acide niflumique.

L'acide métiazinique par contre s'est souvent montré inactif ceci est dû peut-être à la présence d'un atome de soufre dans sa molécule.

Les anti-inflammatoires non stéroïdiques testés ont montré une action inhibitrice sur la lactate deshydrogénase du cerveau, des glandes surrénales et des hématies. Sur le coeur, nous n'avons pas noté de grosses variations. Par contre, les activités enzymatiques du foie, du muscle jambier et du sérum ont été activées.

Nous avons signalé, au cours de ce travail, l'action supposée des anti-inflammatoires non stéroïdiques sur la membrane érythrocytaire, ces derniers provoquant un départ de la lactate-deshydrogénase intra-cellulaire.

Le mécanisme d'action de nombreuses substances utilisées comme agents anti-inflammatoires n'est pas complètement élucidé. Plusieurs auteurs se sont penchés sur ce problème. Nous avons relevé les travaux de :

- P. BASTIDE et J. BASTIDE (8) qui après avoir passé en revue les différents anti-inflammatoires utilisés, signalé les principaux tests pharmacologiques, leurs actions, les formes employées, les accidents puis leurs indications, émettent plusieurs hypothèses sur le mécanisme d'action des anti-inflammatoires stéroïdiques d'une part et les anti-inflammatoires non stéroïdiques d'autre part.

Ces auteurs pensent que les stéroïdes agiraient en diminuant la perméabilité cellulaire et en ralentissant dans la cellule les processus métaboliques. Il y aurait une action inhibitrice sur la formation de certains enzymes et par suite de la stabilisation des lysosomes, défaut d'activité enzymatique.

Dans le cas des substances à caractère acide (acide niflumique, métiazinique et indole acétique) elles pourraient en se fixant sur certaines protéines, qui normalement exercent un effet pro-inflammatoire comme l'histidine décarboxylase, les protéases du type kallicréine, les kininogènes, les neutraliser.

La fixation de ces produits sur les mitochondries qui par découplément des phosphorylations oxydatives, donc par ralentissement du métabolisme gênerait la mise en place des réactions granulomateuses.

- ORONSKY et coll (87) qui ont testé l'effet anti-inflammatoire possible des composés qui sont connus pour se lier au groupe thiol (SH) car ces groupes sont essentiels pour les réactions de transfert impliquées dans la synthèse protéinique. De plus, l'activité de certaines drogues anti-inflammatoires a été essayée en présence d'un composé portant un groupe SH.

Ces expériences ont été faites sur le Rat mâle Sherman, à qui l'on a provoqué une inflammation expérimentale. L'anti-inflammatoire utilisé fut l'indométacine à la dose de 400 mcg qui supprime effectivement le processus inflammatoire quand il est localement administré. Lorsque ce produit est combiné à la cystéine, l'activité anti-inflammatoire de la drogue est diminuée d'une manière significative. De plus, l'application locale de la cystéine diminue l'action anti-inflammatoire de l'indométacine administrée intra-péritonéalement.

Il semble que la suppression de la réponse inflammatoire par l'indométacine peut-être rattachée, du moins en partie à leur action sur les groupes SH. Ces auteurs ont montré que lorsque l'on employait comme agent anti-inflammatoire l'hémisuccinate d'hydrocortisone, la cystéine ne modifiait pas son activité ce qui tendrait à supposer que ce composé modifierait un autre mécanisme de l'inflammation.

Nous avons vu, dans l'étude de la lactate deshydrogénase que cet enzyme était constitué de plusieurs acides aminés dont la cystéine. Ce dernier ayant un rôle essentiel comme site actif et comme porteur de groupes SH. On peut supposer que ces groupes ont une action sur certains anti-inflammatoires non corticoïdes. Nous avons constaté pour notre part, que suivant les organes l'action lactate deshydrogénasique était modifiée. Ceci pourrait provenir en partie de l'action des anti-inflammatoires sur les groupes SH de l'enzyme.

De nombreuses recherches restent à entreprendre afin de parfaire notre connaissance sur le mécanisme d'action des anti-inflammatoires non stéroïdiques. Pour notre part, nous voulons espérer que ce modeste travail contribuera à une plus large connaissance de la lactate deshydrogénase et des anti-inflammatoires non stéroïdiques et qu'elle permettra au lecteur d'en tirer quelques notions nécessaires à une meilleure connaissance du phénomène inflammatoire.

Vu et Permis d'Imprimer

N° Ph 7/70

Clermont-Ferrand le 4 - 9 - 70

Le Président du Jury

P. BASTIDE

Vu et Permis d'imprimer

N° Ph 7/70

Clermont-Ferrand le 4 - 9 - 70

Le Doyen de la Faculté mixte de

Médecine et de Pharmacie

G. MEYNIEL

BIBLIOGRAPHIE

- 1 - ALBERTY (R.A.) : J. Am. Clin. Sci. 1953, 75, 1928.
- 2 - ANDERSEN (H.) : Acta Histochem., 1965, 21, (1-4), 120-134.
- 3 - ANDERSON (B.M.), KAPLAN (N.O.) : J. Biol. Chem., 1959, 234, 1726.
- 4 - APPELLA (E.), MARKERT (C L.) : Biochem. Biophys. Res. Commun., 1961, 6, 171.
- 5 - ARVY (L.) : Acta Histochem., 1961, 12, 111-136 .
- 6 - BANGA (I.), SZENT-GYORGYI (A.), Von VARGHA (L.) : Z. Physiol. Chem., 1932, 210, 228.
- 7 - BASTIDE (J.) : Thèse Doctorat en Pharmacie, 1967, 124 p.
- 8 - BASTIDE (P.), BASTIDE (J.) : La Pharmacie Hospitalière Française, 1969, 10, 135-146.
- 9 - BASTIDE (J.), BASTIDE (P.), MALET (P.), TURCHINI (J.P.), DASTUGUE (G.) : Ann. Biol. Clin., 1966, 24, 745-755.
- 10 - BASTIDE (P.), BAUDON (J.), DASTUGUE (G.), REBIERE (J.P.) Ann. Biol. Clin., 1960, 18, 307-311.
- 11 - BASTIDE (P.), LAUMIN (A.M.), DASTUGUE (G.) : J. Physiol., 1967, 59, 208.
- 12 - BENITZ (K.F.), HALL (L.M.) : Arch. Int. Pharmacodyn., 1963, 144, 183.
- 13 - BENZI (G.), CREMA (A.), FRIGO (R.M.) : J. Pharm. Sci., 1965, 54, 1689.
- 14 - BERGER (L.), BROIDA (D.) : Sigma Techn. Bull., 1958, 500, 165-168.
- 15 - Von BFISENHERZ (G.), BOLTZE (H.J.), BUCHER (Th.), CZOK (R.), GARBADE (K.H.), MEYER-ARENDT (E.), PFLEIDERER (G.) : Z. Naturforsch., 1953, 8 b, 555.
- 16 - BLANCO (A.), ZINKHAM (W.H.) : Science, 1963, 139, 601.
- 17 - BOISSIER (J.R.), FICHELLE-PAGNY (J.), HORAKOVA (Z.) : Thérapie, 1967, 22, 157.
- 18 - BOISSIER (J.R.), LWOFF (J.M.), HERTZ (F.) : Thérapie, 1970, 25, 46, 60.

- 19 - BONAVIDA (V.), AMORE (G.), AVELLONE (S.), GUARNERI (R.): J. Neurochem., 1965, 12, 37.
- 20 - BONTING (S.L.), POLLAK (V.E.), MUEHRCKE (R.C.), KARK (R.M.) : J. Clin. Invest., 1960, 39, 1381-1385.
- 21 - BÜCHER (K.) : Helv. Physiol. Acta., 1959, 17, 329.
- 22 - BUSH (A.), NAIR (P.V.) : J. Biol. Chem., 1957, 229, 377.
- 23 - CABAUD (P.G.), WROBLEWSKI (F.) : Am. J. Clin. Path., 1958, 30, 234-238.
- 24 - CAHN (R.D.), KAPLAN (N.O.), LEVINE (L.), ZWILLING (E.) : Science, 1962, 136, 962.
- 25 - CHAFFEE (R.R.), BARTLETT (W.L.) : Biochem. Biophys. Acta, 1960, 39, 370.
- 26 - CHASSAGNE (P.), DEVAUX (J.P.) : La revue du Praticien, (21 février 1967), 793-806.
- 27 - CHIEFFI (G.), BOTTE (V.) : Nature, 1963, 200, 793-794.
- 28 - DAWSON (D.M.), GOODFRIEND (T.L.), KAPLAN (N.O.) : Science, 1964, 143, 929.
- 29 - DELBARRE (F.), BROUILHET (H.), KAHAN (A.) : C.R. Soc. Biol., 1968, 38, 162.
- 30 - DENNIS (D.), KAPLAN (N.O.) : J. Biol. Chem., 1960, 235, 810.
- 31 - DIECKHOFF (J.), COBET (G.), KOCH (R.), NUENCHMEYER (R.) : Z. Kimderheilk., 1964, 90, (3), 203-209.
- 32 - DOMENJOZ (R.) : Ann. N.Y. Acad. Sci., 1960, 86, 263-291.
- 33 - DUBE (S.K.), ROHOLT (O.), PRESSMAN (D.) : J. Biol. Chem., 1963, 238, 613.
- 34 - EDSON (N.L.) : Biochem. J., 1947, 41, 145.
- 35 - ELODI (P.) : Acta Physiol. Acad. Sci. Hung., 1958, 13, 213.
- 36 - EPPENBERGER (H.M.), Von FELLEBERG (R.), RICHTERICH (R.), AEBI (H.) : Enzymol. Biol. Clin. Basel., 1962-1963, 2, 139-174.
- 37 - Van EYS (J.), STOLZENBACH (F.E.), SHERWOOD (L.), KAPLAN (N.O.) : Biochem. Biophys. Acta, 1958, 27, 63.
- 38 - FARGE (D.), JEANMART (C.), MESSER (M.) : Brevet Français n° 1 502 614 (29/10/64 - 16/10/67).
- 39 - FIELDHOUSE (B.), MASTERS (C.J.), : Biochim. Biophys. Acta, 1968, 151 - 531.
- 40 - FISHER (C.L.), NIXON (J.C.) : Clin. Biochem., 1967, 1, 34.
- 41 - FONDY (T.P.), EVERSE (J.), DRISCOLL (G.A.), CASTILLO (F.), STOLZENBACH (F.E.), KAPLAN (N.O.) : J. Biol. Chem., 1965, 240, 4219.

- 42 - FONDY (T.P.), PESCE (A.), STOLZENBACH (F.), FREEDBERG (L.), KAPLAN (N.O.) : Biochemistry, 1964, 3, 552.
- 43 - FRANK (W.), HOLTZ (E.) : Z. Physiol. Chem., 1959, 314, 1.
- 44 - FUTTERMAN (S.), KINOSHITA (S.H.) : J. Biol. Chem., 1959, 234, 3174.
- 45 - GARBUS (J.), HIGHMAN (B.), ALTLAND (P.D.) : Am. J. Physiol. 1964, 207, 467.
- 46 - GEREBTZOFF (M.A.) : Path. Biol., 1968, 6, 601-608.
- 47 - GIBSON (B.), DAVISSON (E.O.), BACHKAWAT (B.K.), RAY (B.R.), VESTLING (C.S.) : J. Biol. Chem., 1953, 203, 397.
- 48 - GLENN (E.M.), BOWMAN (B.J.) : Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1969, 130 (4), 1327.
- 49 - GLENN (E.M.), BOWMAN (B.J.), KOSLOWSKE (T.C.) : Biochem. Pharmacol. Spec. Suppl. March, 1968, 27.
- 50 - GOODFRIEND (T.), KAPLAN (N.O.) : Circulation, 1965, 32, 1010 .
- 51 - GREEN (D.E.), BROSTEAUX (J.) : Biochem. J., 1936, 30, 1489.
- 52 - De la HABA (G.), LEDER (I.G.), RACKER (E.) : J. Biol. Chem., 1955, 214, 409.
- 53 - HAKALA (M.T.), GLAID (A.J.), SCHWERT (G.W.) : J. Biol. Chem. 1956, 221, 191.
- 54 - HELM (H.J.), van der : Clin. Chim. Acta, 1962, 7, 124.
- 55 - HERMANN (B.) : Med. Exp., 1959, 1, 3, 170-178.
- 56 - HESS (R.), SCARPELLI (D.G.), PEARSE (A.G.F.) : J. Biophys. Biochem. Cytol., 1958, 4, 753-760.
- 57 - HOFFMAN (Ch.), FAURE (A.) : Bull. Soc. Chim. Fr., 1966, 7, 2316.
- 58 - HUCKER (H.B.), ZACCHEI (A.G.), COX (S.V.), BRODIE (D.A.), CANTWELL (NHR) : J. Pharmacol., 1966, 153 (2), 237-249.
- 59 - IHARA (N.) : Endocrinol. (Japan), 1966, 13, (2), 85-140.
- 60 - JONADET (M.), BASTIDE (P.) : Semaine des Hôpitaux, 1970, à paraître.
- 61 - JULOU (L.), DUCROT (R.), FOURNEL (J.), GANTER (P.), POPULAIRE (P.), DUREL (J.), MYON (J.), PASCAL (S.), PASQUET (J.) : Arzneim Forsch (Drug Res.), 1969, 19, 1207.
- 62 - JULOU (L.), GUYONNET (J.C.), DUCROT (R.), BARDONE (M.C.), BARDONE (M.C.), DETAILLE (J.Y.), LAFFARGUE (B.) : Arzneim. Forsch (Drug Res.), 1969, 19, 1198.
- 63 - KARNES (C.Y.), IHNEN (E.D.), VESTLING (C.S.) : Fed. Proc., 1960, 19, 29.
- 64 - Mc KAY (R.H.), SHIFRIN (S.), KAPLAN (N.O.) : Fed. Proc., 1960, 60, 343.

- 65 - KAZIMIERCZAK (J.) : Acta Anat., 1963, 55, 352-369.
- 66 - Mc KERNS (K. W.) : Biochim. Biophys. Acta, 1962, 65, 536-537.
- 67 - KUBOWITZ (F.), OTT (P.) : Biochem. Z., 1943, 314, 94.
- 68 - KUN (E.) : Biochim. Biophys. Acta, 1957, 25, 135.
- 69 - LEVY (H.), DEANE (H. W.), RUBIN (B. L.) : J. Histochem. Cytochem., 1959, 7, 320.
- 70 - LEVY (H.), DEANE (H. W.), RUBIN (B. L.) : Endoc., 1959, 65, 932-943.
- 71 - MARKERT (C. L.) : Science, 1963, 140, 1329.
- 72 - MARKERT (C.), MOLLER (F.) : Proc. Nat. Acad. Sci., 1959, 45, 753.
- 73 - MEHLER (A. H.), KORNBERG (A.), GRISOLIA (S.), OCHOA (S.) : J. Biol. Chem., 1948, 174, 961.
- 74 - MEISTER (A.) : J. Biol. Chem., 1950, 184, 117.
- 75 - MEISTER (A.) : Biochem. Prep., 1952, 2, 18.
- 76 - MEISTER (A.) : J. Biol. Chem., 1952, 199, 373.
- 77 - MELLA (K.), TORFF (H. J.), FOLSCH (E. T. J.), PFLEIDERER (G.) : Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem., 1969, 350, 28.
- 78 - MESSER (M.), FARGE (D.), GUYONNET (J. C.), JEAUMART (C.), JULOU (L.) : Arzneim Forsch (Drug Res.), 1969, 19, 1193.
- 79 - MORI (M.), SAKAMOTO (T.), SHIBA (R.), KAKAMOTO (T.) : Gann., 1966, 57 (6), 627-636.
- 80 - NATOCHIN (Y. V.) : Fed. Proc. (Trans. suppl.), 1963, 22, 1078-1080.
- 81 - NEILANDS (J. B.) : J. Biol. Chem., 1954, 208, 225.
- 82 - NEILANDS (J. B.) : J. Biol. Chem., 1952, 199, 373.
- 83 - NISSELBAUM (J. S.), BODANSKY (O.) : J. Biol. Chem., 1961, 236, 323.
- 84 - NYGAARD (A. P.) : Acta Chem. Scand., 1956, 10, 408.
- 85 - OGATA (T.), MORI (M.) : J. Histochem. Cytochem., 1964, 12, 171-182.
- 86 - OKABE (K.), HAYAKAWA (T.), HAMADA (M.), KOIKE (M.) : Biochemistry, 1968, 7, 79.
- 87 - ORONSKY (A. L.), TRINER (L.), STEINSLAND (O. S.), NAHAS (G. G.) : Nature, 1969, 223, 619-621.
- 88 - OTTOLENGHI (P.), DENSTEDT (O.) : Can. J. Biochem., 1958, 36, 1075.
- 89 - PESCE (A.), FONDY (T. P.), STOLZENBACH (F.), CASTILLO (F.), KAPLAN (N. O.) : J. Biol. Chem., 1967, 242, 2151.

- 90 - PESCE (A.), Mac KAY (R.H.), STOLZENBACH (F.), CAHN (R.D.), KAPLAN (N.O.) : J. Biol. Chem. 1964, 239, 1753.
- 91 - PESCE (A.), Mac KAY (R.H.), STOLZENBACH (F.), CAHN (R.D.), KAPLAN (N.O.). : J. Biol. Chem. 1964, 239, 1953.
- 92 - PFLEIDERER (G.), JECKEL (D.) : Biochem. z., 1957, 329, 370.
- 93 - PFLEIDERER (G.), JECKEL (D.), WIELAND (T.) : Biochem. z. 1957, 329, 104.
- 94 - PFLEIDERER (G.), JECKEL (D.), WIELAND (T.) : Biochem. z., 1958, 330, 296.
- 95 - PFLEIDERER (G.), WACHSMUTH (E.D.) : Klin. Wschr., 1961, 39, 352.
- 96 - PLAGEMANN (P.G.W.), GREGORY (K.F.), WROBLEWSKI (F.) : J. Biol. Chem. 1960, 235, 2288.
- 97 - PLATT (D.S.), COCKRILL (B.L.) : Biochem. Pharm., 1969, 18, 429-444.
- 98 - POPULAIRE (P.), REILAIN (B.), PASCAL (S.), LEBRETON (G.), DECOUVELAERE (B.) : Arzneim, Forsch (Drug Res.), 1969, 19, 1214.
- 99 - PRESTON (J.A.), BRIERE (R.O.), BATSAKIS (J.G.) : Am. J. Clin. Pathol. 1965, 43, 256.
- 100 - QUASTEL (J.H.), WOOLDRIDGE (W.R.) : Biochem. J., 1928, 22, 689.
- 101 - RACKER (E.) : J. Biol. Chem. 1951, 196, 347.
- 102 - REBIERE (J.P.) : Thèse Doct. Univ. Pharmacie, Clermont-Ferrand 1961.
- 103 - RINGOIR (S.), WIEME (R.J.) : Lancet, 1965, 11, 906.
- 104 - RINGOIR (S.), WIEME (R.J.), REGNIERS (P.) : J. d'Urol. et de Nephrol. 1964, 70, 126.
- 105 - ROSA (C.G.) : J. Histochem. Cytochem., 1955, 3, 399.
- 106 - ROSA (J.), SCHAPIRA (F.) : Nature, Lond., 1965, 204, 883.
- 107 - ROSALKI (S.B.), WILKINSON (J.H.) : Lancet, 1959, 2, 327-328.
- 108 - Di SABATO (G.), KAPLAN (N.O.), WINER (A.D.) : Acta Chem Scand., 1963, 17, 520.
- 109 - SAYRE (F.W.), HILL (B.R.) : Proc. Soc. Exp. Biol. (N.Y.), 1957, 96, 695.
- 110 - SCHELLENBERG (K.A.) : J. Biol. Chem. 1965, 240, 1165.
- 111 - SCHWERT (G.W.), HAKALA (M.T.) : Arch. Biochem. Biophys. 1952, 38, 55.

- 112 - SELYE (H.) : Arch. Int. Pharmacod. , 1954, 97, 979.
- 113 - SHAW (C.R.) : Proc. Nat. Acad. Sci. , U.S.A. , 1963, 50, 211-214.
- 114 - SHEWEL (J.) : Brit. J. Pharmacol. , 1957 , 12, 133.
- 115 - SKIDMORE (J.F.), WHITEHOUSE (H.W.) : Biochem. J. , 1966, 100, 51-52.
- 116 - SOCQUET (I.M.), LADLER (K.J.) : Arch. Biochim. Biophys. , 1951, 25, 171.
- 117 - STAVE (U.) : Biol. Néonat. Ger. , 1960, 2, 1833.
- 118 - STEGINK (L.D.), WESTLING (C.S.) : J. Biol. Chem. , 1966, 241, 4923.
- 119 - STRAUB (F.B.) : Biochem. J. , 1940, 34, 483.
- 120 - TAKENAKA (Y.), SCHWERT (G.W.) : J. Biol. Chem. , 1956, 223, 177.
- 121 - THIERS (R.E.), VALLEE (B.L.) : Ann. N.Y. Acad. Sci. 1958, 75, 214.
- 122 - THUNBERG (T.) : Skand. Arch. Physiol. , 1920, 40, 1 .
- 123 - TUBBS (P.K.), GREVILLE (G.D.) : Biochem. Biophys. . Acta , 1959, 34, 290-291.
- 124 - VESELL (E.S.) : J. Exp. Med. Surg. , 1965, 23, 10.
- 125 - VESELL (E.S.), BEARN (A.G.) : Proc. Soc. Exp. Biol. Med. , 1957, 94, 96.
- 126 - VESELL (E.S.), BEARN (A.G.) : J. Gen. Physiol. , 1962, 45, 553.
- 127 - VESELL (E.S.), FELDMAN (M.P.), FRANK (E.D.) : Proc; Exp. Biol. Med. , 1959, 101, 644.
- 128 - VIAUD (P.) : J. Pharm. Pharmacol. , 1954, 6, 361.
- 129 - WACHSMUTH (E.D.), PFLEIDERER (G.), WIELAND (T.) : Biochem. Z. 1964, 340, 80.
- 130 - WEBB (E.S.) : Enzym. Biol. Clin. , 1965, 23, 10.
- 131 - WHITEHOUSE (H.W.), SKIDMORE (J.F.) : J. Pharm. Pharmacol. , 1965 b, 17, 668-671.
- 132 - WIELAND (T.H.), PFLEIDERER (G.) : Bioch. Z. , 1957, 329, 112-116.
- 133 - WIELAND (T.), PFLEIDERER (G.), ORTANDERL (F.) : Biochem. Z. , 1959, 331, 103.
- 134 - WIELAND (I.), PFLEIDERER (G.), HAUPT (I.), WORNER (W.) : Bioch. Z. , 1959, 332, 1.
- 135 - WIEME (R.J.) : Studies on agar gel electrophoresis, Ed. Arseia, 1 vol. Bruxelles (1959).
- 136 - WIEME (R.J.) : Postgraduate medicine, 1964, 35, A 38.
- 137 - WIEME (R.J.) : Agargel electrophoresis, 1 vol. Elsevier publish. Cy. Amsterdam, 1965.
- 138 - WIEME (R.J.), DEMEULENAERE (L.) : Acta Gastroenterologica. Belg. , 1959, 22, 69.

- 139 - WIEME (R. J.), Van MAERCKE (Y.) : Ann. N.Y. Acad. Sci., 1961, 94, 898.
 - 140 - WIEME (R. J.), Van MAERCKE (Y.) : J. Biol. Chem., 1964, 239, 444.
 - 141 - WILHELM (G.) : Arzneim. Forsch, 1960, 10, (2), 129-133.
 - 142 - WINDER (C. V.), WAX (J.), BURR (V.), BEEN (M.), ROSIERE (C. E.) : Arch. Int. Pharmacod., 1958, 116, 261.
 - 143 - WINER (A. D.) : Ph. D. Dissertation, Duke Uni., 1957.
 - 144 - WINER (A. D.) : Biochem. J., 1960, 76, 5 P.
 - 145 - WINER (A. D.), SCHWERT (G. W.) : J. Biol. Chem., 1958, 231, 1065.
 - 146 - WINER (A. D.), SCHWERT (G. W.) : J. Biol. Chem., 1959, 234, 1155.
 - 147 - WINER (A. D.), SCHWERT (G. W.), MILLAR (D. B. S.) : J. Biol. Chem., 1959, 234, 1149.
 - 148 - WINTER (C. A.), MEZEY (K. C.) : Rhumatologie, 1964, 16, 405.
 - 149 - WINTER (C. A.), RISLEY (E. A.), NUSS (G. W.) : Proc. Soc. exp. Biol. Med., 1963, 111, 544.
 - 150 - WINTER (C. A.), RISLEY (E. A.), NUSS (G. W.) : J. Pharmacol. Exp. Ther. 1963, 141, 369.
 - 151 - WOENCKAUS (C.), BERGHAUSER (O.), PFLEIDERER (G.) : Hoppe Seyler's z. Physiol. Chem., 1969, 350, 473.
 - 152 - WORTMAN (B.), SCHNEIDER (A.) : Biochem. Biophys. Research. Commun. 1960, 2, 179.
 - 153 - WUNDERLY (C.) : Arzneim. Forsch, 1960, 10, 11, 910-911.
 - 154 - YU (T. F.), BURNS (J. J.), PATON (B. C.), GUTMAN (A. B.), BRODIE (B. B.) : J. Pharmacol. exp. Ther., 1958, 123, 63.
 - 155 - ZELITCH (I.) : J. Biol. Chem., 1957, 224, 251.
-

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	3
RECHERCHES BIBLIOGRAPHIQUES	
Chapitre I La lactate deshydrogénase et ses isoenzymes	7
Chapitre II Quelques anti-inflammatoires non stéroïdiques	19
I L'indométacine	
II L'oxyphenbutazone	
III L'acide niflumique	
IV L'acide métiazinique	
RECHERCHES EXPERIMENTALES	
<i>Les techniques expérimentales</i>	
Chapitre I Protocole général d'expérimentation	43
Chapitre II Dosage de la lactate deshydrogénase	45
Chapitre III Séparation des isoenzymes de la lactate deshydrogénase	49
<i>Les résultats expérimentaux</i>	
Chapitre I Etude de la lactate deshydrogénase du cerveau de Lapin	55
Chapitre II Etude de la lactate deshydrogénase du coeur de Lapin	61
Chapitre III Etude de la lactate deshydrogénase du foie de Lapin	68
Chapitre IV Etude de la lactate deshydrogénase du muscle jambier de Lapin	75
Chapitre V Etude de la lactate deshydrogénase des reins de Lapin	82
Chapitre VI Etude de la lactate deshydrogénase des glandes surrénales de Lapin	89
Chapitre VII Etude de la lactate deshydrogénase du sérum de Lapin	96

Chapitre VIII Etude de la lactate deshydrogénase des hématies de Lapin	103
---	-----

RESUME ET CONCLUSIONS GENERALES	111
---------------------------------	-----

BIBLIOGRAPHIE	117
---------------	-----

